

Aus dem Institut für Virologie
Geschäftsführender Direktor: Herr Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einfluss des Nipahvirus-Matrixproteins auf die
Lokalisation von viralen Nukleokapsiden und
*inclusion bodies***

Inauguraldissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Marc Oliver Ringel
aus Solingen

Marburg an der Lahn, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
18.10.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Herr Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Frau Prof. Dr. A. Maisner
1. Korreferent:	Herr Prof. Dr. R. Jacob

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
I. Einleitung.....	5
1. Das Nipahvirus.....	5
1.1 Taxonomie.....	5
1.2 Epidemiologie.....	6
1.3 Virus- und Genomaufbau	7
1.4 Replikationszyklus des NiV	8
1.5 Reverse Genetik	10
1.6 Die Oberflächen-Glykoproteine	12
1.6.1 Das Glykoprotein (G).....	12
1.6.2 Das Fusionsprotein (F)	12
1.7 Die Nukleokapsid-Proteine.....	13
1.7.1 Das Nukleoprotein (N)	13
1.7.2 Das Phosphoprotein (P)	14
1.7.3 Die RNA-Polymerase (L).....	14
1.8 Paramyxovirale Matrixproteine	15
1.8.1 Das NiV-Matrixprotein	16
2. Das Zytoskelett	20
2.1 Bestandteile des Zytoskeletts	20
2.2 Rolle des Zytoskeletts in Virusinfektionen	22
3. Fragestellung und Zielsetzung.....	23

II. Ergebnisse	24
1. Untersuchung des Zelltyp-abhängigen Nipahvirus Matrixprotein-Transports	24
2. Einfluss des Nipahvirus-Matrixproteins auf die Lokalisation der <i>inclusion bodies</i> in der Infektion und im Kotransfektionssystem	27
3. Kolokalisation von NiV-IB mit zellulären Kompartimenten	30
4. Charakterisierung der M-abhängigen Lokalisation der IB an der Plasmamembran	32
4.1 Die periphere Formierung von großen IB ist unabhängig von den viralen Oberflächen-Glykoproteinen	32
4.2 Struktur-Analysen der IB mittels Elektronenmikroskopie	35
4.3 Spezifität der M-abhängigen Akkumulation der IB an der Plasmamembran ..	
.....	38
4.4 Der nukleäre Transit des M-Proteins ist essentiell für die Lokalisierung der IB	41
4.5 Charakterisierung des rNiV-M _{NESmut}	44
4.6 Unterschiede in der Oligomerisierung der M-Mutanten	47
5. Einfluss des Zytoskeletts auf die Lokalisation der IB	49
5.1 Intakte und dynamische Aktinfilamente sind essentiell für den Oberflächentransport des M-Proteins	49
5.2 Die Bildung peripherer IB benötigt ein intaktes Aktinzytoskelett	51
6. Die C-terminale Region des Ms beeinflusst die Akkumulation der IB an die Plasmamembran	53
III. Diskussion	56
1. Zelltyp-abhängige Kinetik beim Kerntransit des NiV-Ms	56
2. Die IB-Lokalisation an der Plasmamembran ist NiV-M abhängig	58

2.1	Die M-N Interaktion ist essentiell für IB-Lokalisation an der Plasmamembran	58
2.2	Die IB-Bildung an der Plasmamembran kann nur durch Henipavirus-M Proteine induziert werden	59
2.3	Die Voraussetzungen für die Kolo­kalisierung von NiV-M mit perinukleären und peripheren IB unterscheiden sich	60
2.4	Die Kolo­kalisierung mit den perinukleären IB könnte von der Membranassoziation des M-Proteins abhängen	60
3.	Perinukleäre und Plasmamembran-assoziierte IB sind von einander unabhängige Kompartimente	62
3.1	Perinukleäre IB bilden eigenes Kompartiment	62
3.2	Transkription und Replikation in räumlicher Nähe zu den perinukleären IB	63
3.3	Die Bildung peripherer IB an der Plasmamembran resultiert aus einem M-abhängigen RNP-Transport	64
3.4	Rekombinate NiV mit einem Transport-defekten NiV-M haben eine deutlich reduzierte Infektiosität.....	65
4.	Die Rolle des Zytoskeletts beim NiV-M abhängigen RNP-Transport an die Plasmamembran	67
5.	Der C-Terminus des NiV-Ms ist essentiell für die Akkumulation an der Plasmamembran	68
6.	Modell des M-abhängigen RNP-Transports an die Plasmamembran.....	69
IV.	Methoden	71
1.	Molekularbiologische Methoden	71
1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	71
1.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	71
1.3	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	72

1.4	Vektorverdau, Dephosphorylierung und Ligation	73
1.5	Umklonierung des Nipahvirus Nukleoproteins und Phosphoproteins	73
1.6	Die gerichtete Mutagenese (<i>Site-Directed Mutagenesis</i>) zur Herstellung der mutierten NiV-M-Konstrukte	75
1.7	Herstellung eines Membran-assoziierten NiV-M _{K258A} -Konstrukts	77
1.8	Hitzeschocktransformation	78
1.9	Präparation von Plasmid-DNA.....	79
1.10	RNA-Isolierung.....	79
1.11	cDNA-Synthese	80
1.12	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qPCR)	80
2.	Zellbiologische Methoden	82
2.1	Zellkultur permanenter Zelllinien.....	82
2.2	Aussäen von Zellen.....	83
2.3	Transfektion der Zellen	83
2.4	Austitrieren der Zytoskelett-Inhibitoren-Konzentration in Vero76-Zellen..	85
3.	Virologische Methoden	86
3.1	Herstellung von rekombinanten Nipahviren.....	86
3.2	Infektion von Vero76-Zellen.....	86
4.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	87
4.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA)	87
4.1.1	Einzel- und Koexpression von NiV-Proteinen in transient transfizierten Zellen.....	88
4.1.2	Immunfluoreszenzanalyse von NiV-M und NiV-IB in infizierten Zellen	89
4.1.3	Kolokalisationsstudien von NiV-IB mit zellulären Kompartimentmarkern	90
4.1.4	Kokokalisationsstudien von NiV-IB und anderen viralen Matrixproteinen	91

4.1.5	Koimmunfluoreszenz-Analyse von NiV-M, NiV-IB und Zytoskelett-Markern in transient transfizierten Zellen.....	91
4.1.6	„Nukleokapsid-Lokalisations-Makro“ (NukLoM) zur Quantifizierung der Lokalisation von NiV-IB	93
4.2	<i>Live cell imaging</i> des NiV-Ms in MDCK-Zellen.....	94
4.3	Etablierung des <i>live cell imaging</i> in kotransfizierten Vero76-Zellen.....	95
4.4	Transmissions-Elektronenmikroskopie transfizierter Vero76-Zellen	98
4.5	Zellyse zur Untersuchung der Oligomerisierung der NiV-M-Mutanten.....	98
4.6	SDS-PAGE und Western Blot	99
V.	Material	100
1.	Materialien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	100
2.	Antikörper	101
3.	Enzyme	102
4.	Kits	102
5.	Medien	102
5.1	Wachstumsmedien für eukaryotische Zellen.....	103
5.2	Wachstumsmedien für prokaryotische Zellen	103
6.	Plasmide	103
7.	Oligonukleotide	104
8.	Puffer.....	105
VI.	Literaturverzeichnis.....	107
VII.	Anhang.....	116
A.1	Abkürzungsverzeichnis	116

A.2 Tabellenverzeichnis.....	120
A.3 Abbildungsverzeichnis.....	121
A.4 Publikationsliste.....	123
A.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer	125
A.6 Danksagung	126

Zusammenfassung

Das Nipahvirus (NiV) ist ein hochpathogenes, BSL-4 klassifiziertes Paramyxovirus. Das Hüll-assoziierte Matrixprotein (NiV-M) spielt eine zentrale Rolle beim Virus-Assembly und der Bildung infektiöser Viruspartikel, weil es den Kontakt zwischen den im Zytoplasma gebildeten Nukleokapsiden (RNPs) und den NiV-Oberflächen-Glykoproteinen vermittelt. Um diese wichtige Funktion zu erfüllen, muss das NiV-M an die Plasmamembran gelangen, wobei es in einigen Zelltypen vorher durch den Zellkern transportiert wird. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte mit Hilfe verschiedener Kernimport- und Kernexport-Mutanten und Immunfluoreszenzanalysen in fixierten und lebenden Zellen gezeigt werden, dass das NiV-M auch in Zelltypen, in denen es bislang nicht im Zellkern nachweisbar war, einen Kerntransit durchlaufen muss, bevor es an die Plasmamembran transportiert wird.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, wo und wie das NiV-M mit viralen RNPs interagiert. Erste Untersuchungen hatten gezeigt, dass virale RNPs in infizierten Zellen in großen zytoplasmatischen *inclusion bodies* (IB) akkumulieren. Diese liegen teilweise perinukleär und teilweise an der Plasmamembran vor, wo letztendlich das Virus-Assembly stattfindet. Um zu klären, ob das NiV-M beim Transport der RNPs an die Plasmamembran und für die Bildung der unterschiedlich lokalisierten IB eine Rolle spielt, wurde der Einfluss des NiV-Ms auf die IB-Verteilung untersucht. Sowohl Infektions- als auch Kotransfektionsstudien zeigten, dass für die Bildung von peripheren IB an der Plasmamembran und das Virus-Assembly die Expression von funktionellem, korrekt durch den Kern transportiertem NiV-M essentiell ist. Transport-defekte NiV-M Mutanten oder fremde Matrixproteine wie z.B. von Masern- oder Ebolaviren, konnten keine IB-Bildung an der Plasmamembran induzieren. Sie kolokalisierten allerdings mit perinukleären IB, was vermuten lässt, dass diese ein eigenes zelluläres Kompartiment bilden, das stark exprimierte, zytosolische Proteine rekrutieren kann. Die IB an der Plasmamembran bilden sich unabhängig davon, wenn funktionelles NiV-M vorhanden ist. Die Vermutung, dass sich perinukleäre und periphere IB prinzipiell unterscheiden, konnte auch auf ultrastruktureller Ebene durch elektronenmikroskopische Studien bestätigt werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde durch Studien mit verschiedenen Zytoskelett-Inhibitoren gezeigt, dass eine Zerstörung der Aktinfilamente durch Cytochalasin D den M-Transport und die IB-Bildung an der Plasmamembran verhindern kann. Dies lässt vermuten, dass das Aktinzytoskelett aber nicht die Mikrotubuli eine wesentliche Rolle für das NiV-M vermittelte Virus-Assembly spielen.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit neue grundlegende Kenntnisse über den intrazellulären Transport des NiV-Ms und die Entstehung von Plasmamembran-assoziierten *inclusion bodies* gewonnen werden, beides essentielle Voraussetzungen für eine effiziente Neubildung und Freisetzung infektiöser Nipahviren.

Summary

Nipah virus (NiV) is a biosafety level 4 (BSL-4) classified paramyxovirus. The NiV matrix protein (NiV-M) plays a major role in virus assembly and is indispensable for the production of infectious viral particles because it mediates the contact between cytosolic viral nucleocapsids (RNPs) and the NiV surface glycoproteins. To fulfil its important functions, NiV-M must be transported to the plasma membrane. In some cell types, NiV-M surface trafficking is known to be preceded by a transport through the nucleus. In the first part of this thesis, nuclear import and export NiV-M mutants were characterized by immunofluorescence analyses in fixed and living cells. This study revealed that a nuclear transit of NiV-M is principally required for a successful plasma membrane transport, even in cell types in which nuclear NiV-M cannot be detected in steady state analyses.

The second part of this thesis addressed the question, where and how NiV-M interacts with viral RNPs. First studies in infected cells had shown that viral RNPs accumulated in large cytoplasmic inclusion bodies (IB). These were either located perinuclearly or were closely associated with the plasma membrane, where the virus assembly occurs. To determine, if NiV-M plays a role in RNP transport to the plasma membrane and in the formation of the two differently located IB, the influence of NiV-M on the localization of IB was analyzed. Both, infection and cotransfection studies showed that correct nuclear trafficking and subsequent surface targeting of NiV-M was essentially needed for the formation of IB at the plasma membrane and for virus assembly. Transport-defect NiV-M mutants and matrix proteins of other viruses such as measles or Ebola viruses, could not support the formation of plasma membrane associated IB. However, these non-functional M proteins colocalized with perinuclear IB suggesting that perinuclear IB represent a separate cellular compartment that recruits abundantly expressed cytosolic proteins. IB at the plasma membrane are formed independently if functional NiV-M is present. This idea of two separate IB types was also supported by electron-microscopic studies revealing that perinuclear and peripheral IB differed ultrastructurally.

In the last part of this thesis, studies with different cytoskeleton inhibitors revealed that actin disruption by Cytochalasin D efficiently prevented M transport and IB

accumulation at the plasma membrane. This indicates that actin filaments rather than microtubuli play an essential role in the NiV-M mediated virus assembly.

Altogether, this thesis provides new fundamental knowledge about the intracellular transport of NiV-M and the formation of plasma membrane associated inclusion bodies, both essential prerequisites for efficient assembly and release of infectious Nipah viruses.

I. Einleitung

1. Das Nipahvirus

1.1 Taxonomie

Das hochpathogene Nipahvirus (NiV) bildet innerhalb der *Paramyxoviridae* mit dem Hendravirus (HeV, Murray *et al.*, 1995), dem Cedarvirus (CeV, Marsh *et al.*, 2012), dem Mojiangvirus (MojV, Wu *et al.*, 2014) und dem Kumasivirus (KV, Drexler *et al.*, 2012) das Genus *Henipavirus* (Afonso *et al.*, 2016). Wie bei allen Paramyxoviren, handelt es sich beim NiV um ein umhülltes Virus, dessen Genom aus einem RNA-Einzelstrang besteht, der in negativer Orientierung vorliegt. Aufgrund dieser Eigenschaft werden die *Paramyxoviridae*, wie auch *Filo-*, *Pneumo-* und *Rhabdoviridae*, in die Ordnung der *Mononegavirales* eingeordnet (siehe Tabelle I.1).

Tabelle I.1: Taxonomie der Mononegavirales (modifiziert nach Afonso *et al.*, 2016)

Familie	Genus	Beispiele
<i>Filoviridae</i>	<i>Ebolavirus</i>	Ebolavirus (EBOV)
	<i>Marburgvirus</i>	Marburgvirus (MARV)
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Avulavirus</i>	Newcastle Disease Virus (NDV)
	<i>Henipavirus</i>	Hendravirus (HeV)
		Nipahvirus (NiV)
		Cedarvirus (CeV)
		Mojiangvirus (MOjV)
		Kumasivirus (KV)
	<i>Morbilivirus</i>	Hundestaupavirus (CDV)
		Masernvirus (MV)
	<i>Respirovirus</i>	Humanes Parainfluenzavirus 3 (hPIV 3)
		Sendaivirus (SeV)
	<i>Rubulavirus</i>	Mumpsvirus (MuV)
<i>Pneumoviridae</i>	<i>Orthopneumovirus</i>	Respiratorisches Synzytialvirus (RSV)
	<i>Metapneumovirus</i>	Humanes Metapneumovirus (hMPV)
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	Tollwutvirus (RABV)

1.2 Epidemiologie

Im Zeitraum von September 1998 bis Juni 1999 kam es in Malaysia und Singapur zu einem Ausbruch schwerer, fiebriger Enzephalitiden mit Mortalitätsraten von 40 % (Chua *et al.*, 1999). Im März 1999 wurde schließlich ein neues Paramyxovirus als Erreger dieser Erkrankungen isoliert und nach dem Ort „Kampung Sungai Nipah“, dem Wohnort des ersten nachweislich infizierten Patienten, Nipahvirus (NiV), benannt (Chua *et al.*, 2000). Das NiV ist ein zoonotisches Paramyxovirus, welches auf molekularer und antigenischer Ebene deutliche Ähnlichkeiten zum Hendravirus (HeV) aufweist. HeV konnte 1994 in Australien erstmals in Pferden und Menschen nachgewiesen werden (Murray *et al.*, 1995). Der natürliche Wirt der Henipaviren sind fruchtfressende Flughunde der Gattung *Pteropus*, die zwar nicht erkranken, aber die Viren über Urin und Speichel ausscheiden (Yob *et al.*, 2001; Halpin *et al.*, 2007). Während der NiV-Ausbrüche in Malaysia und Singapur kam es zu einer Virusübertragung von Flughunden auf Schweine und anschließend von Schweinen auf Menschen (CDC, 1999; Chua *et al.*, 2000). Seit 2001 kommt es zu saisonalen NiV-Ausbrüchen in Bangladesch, bei denen gezeigt werden konnte, dass das Schwein nicht zwingend als Zwischenwirt notwendig ist. Die NiV-Enzephalitiden zeigen in Bangladesch eine signifikant höhere Mortalitätsrate von ca. 70 % (Lo und Rota, 2008). In diesen jüngeren Ausbrüchen kam es neben einer direkten Übertragung des Virus von Flughunden auf den Menschen auch häufig zu Mensch-Mensch-Übertragungen (Luby *et al.*, 2006). Es ist nicht bekannt, welche Voraussetzungen für diese Mensch-Mensch-Übertragungen gegeben sein müssen. Wahrscheinlich spielt aber die Effizienz der Virusausscheidung in Form von Körperflüssigkeiten eine wichtige Rolle. Die direkte Übertragung des Virus von Flughunden auf den Menschen kann auf den Verzehr von kontaminiertem, rohem Palmensaft zurückgeführt werden, in dem das NiV bis zu sieben Tagen infektiös bleibt (Khan *et al.*, 2012; de Wit *et al.*, 2014).

Neben Flughunden, Schweinen und Menschen können Nipahviren auch Katzen, Hamster, Meerschweinchen, Frettchen und Affen erfolgreich infizieren (Hooper *et al.*, 2001; Yob *et al.*, 2001; Chua *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2003; Rockx *et al.*, 2011). Aufgrund dieses ungewöhnlich breiten Wirtsspektrums und der hohen Pathogenität in den meisten Säugerspezies sind Nipahviren bedeutende zoonotische Erreger, gegen die es

bislang weder eine Therapie, noch eine zugelassene Impfung gibt. Somit sind die NiV als Infektionserreger der höchsten biologischen Sicherheitstufe (BSL-4) eingeordnet.

1.3 Virus- und Genomaufbau

Beim NiV handelt es sich, wie bei allen Paramyxoviren, um ein umhülltes Virus, dessen Genom aus einem nichtsegmentierten RNA-Einzelstrang besteht, der in negativer Orientierung vorliegt. Die Viruspartikel sind pleomorph und können in einer Größe von 60 nm bis 600 nm vorliegen (Hyatt *et al.*, 2001; Dietzel *et al.*, 2015). Das RNA-Genom wird vom viralen Nukleoprotein (N), dem Phosphoprotein (P) und der viralen Polymerase (L) komplexiert und bildet so das Nukleokapsid (RNP). Das RNP wird von der viralen Lipidhülle umgeben, welche die drei NiV-Hüllproteine enthält: die beiden Oberflächen-Glykoproteine G und F und das von innen an die Lipidmembran angelagerte Matrixprotein (M) (Abb. I.1 A). Das Genom beginnt mit einer sogenannten *leader*-Sequenz, die essentiell für die Initiation der Replikation ist und bei der Synthese des Positivstrangs als Promotor dient. Anschließend folgen in 3'-5'-Orientierung die kodierenden Bereiche für die sechs Strukturproteine (3'-N-P-M-F-G-L-5'), die jeweils durch nichtkodierende, intergenische Regionen getrennt sind (Abb. I.1 B).

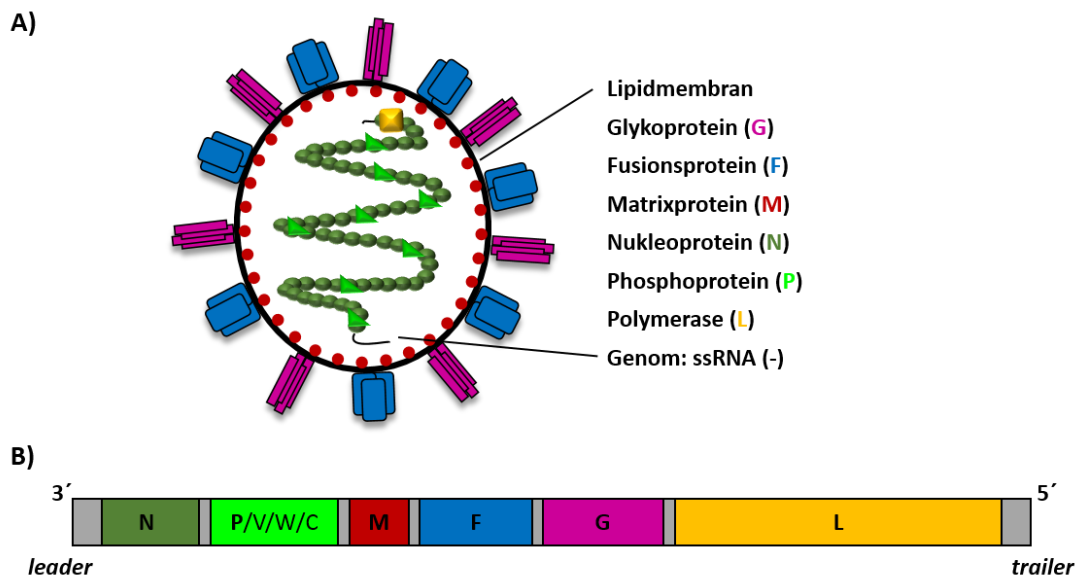


Abbildung I.1: Schematische Darstellung (A) des NiV-Partikels und (B) des NiV-Genoms. N: Nukleoprotein, P: Phosphoprotein (V, W, C: Nichtstrukturproteine), M: Matrixprotein, F: Fusionsprotein, G: Glykoprotein, L: Polymerase, graue Kästchen: intergenische Regionen.

Der *open reading frame* (ORF) des P-Proteins kodiert durch einen alternativen ORF und *RNA-editing* für drei weitere Nichtstrukturproteine V, W und C (Harcourt *et al.*, 2000; Lamb und Kolakofsky, 2001). Am 5'-Ende befindet sich die *trailer*-Sequenz, die bei der Synthese des Negativstrangs als Promotor dient (Wang *et al.*, 2000; Harcourt *et al.*, 2001). Das Genom des NiV besitzt eine Länge von etwa 18,2 kb und folgt dabei der „*rule of six*“, d.h. die Anzahl der Nukleotide des Genoms muss ein Vielfaches von sechs sein (Halpin *et al.*, 2004).

1.4 Replikationszyklus des NiV

Mit der Bindung des Glykoproteins G an den zellulären Rezeptor Ephrin-B2 oder -B3 beginnt der Replikationszyklus (Abb. 1.2). Nach Bindung eines NiV-Partikels an eine neue Zelle und der NiV-F vermittelten Fusion der Virushülle mit der Zellmembran wird das Nukleokapsid freigesetzt und gelangt in das Zytoplasma (Tamin *et al.*, 2002). Im Zytoplasma erfolgen alle weiteren Schritte der viralen Replikation. Das virale Genom wird von einem viruseigenen Polymerasekomplex, bestehend aus der viralen RNA-Polymerase L und dem P-Protein, in mRNA transkribiert, wobei monocistronische mRNAs erzeugt werden. Der Polymerasekomplex stoppt nach jedem Gen (Termination) und reinitiiert die Transkription am nächsten Gen. Das gelingt nicht immer, sodass mit zunehmendem Abstand zum 3'-Terminus immer weniger mRNA eines Gens gebildet wird. Dementsprechend werden in den infizierten Zellen unterschiedliche Mengen der Virusproteine produziert, wobei vom N am meisten und vom L am wenigsten Protein vorliegt. Die Proteine N, P, M und L werden an freien Ribosomen im Zytoplasma der Zelle erzeugt, während die Glykoproteine F und G an Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert werden. Liegt genug N-Protein vor, sorgt dieses dafür, dass die Stopcodons der einzelnen Gene überlesen werden (Antitermination), und es zur Synthese von durchgängigen Antigenomen kommt, die als Matrize für neue Virusgenome dienen. Die neuen viralen Genome werden sofort durch das N-Protein enkapsidiert und anschließend mit vorhandenen P- und L-Proteinen komplexiert. Nach der Synthese aller Virusproteine und der Bildung neuer Virusgenome findet das Assembly an der Plasmamembran statt. Während das Oberflächenprotein G über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert wird und dort verbleibt, wird das noch inaktive Fusionsprotein zunächst endozytiert und ist erst nach der proteolytischen

Aktivierung im Endosom in fusionsaktiver $F_{1/2}$ -Form auf der Zelloberfläche zu finden (Diederich *et al.*, 2005; Vogt *et al.*, 2005; Pager *et al.*, 2006; Diederich *et al.*, 2008; Diederich *et al.*, 2012). Das M-Protein gelangt auf zytoplasmatischem Weg ebenfalls an die Plasmamembran. Bislang ist aber unklar, wie dieser Transportweg genau verläuft und auch, wie die Nukleokapside (RNPs) an die Zelloberflächen gelangen. An der Plasmamembran vermittelt das M-Protein dann jedenfalls die Interaktion zwischen den neu gebildeten RNPs und den zytoplasmatischen Domänen der Glykoproteine, insbesondere des F-Proteins. Anschließend erfolgen die Ausstülpung der Zellmembran und die Freisetzung neuer Viruspartikel (Budding; Ciancanelli *et al.*, 2006; Patch *et al.*, 2008).

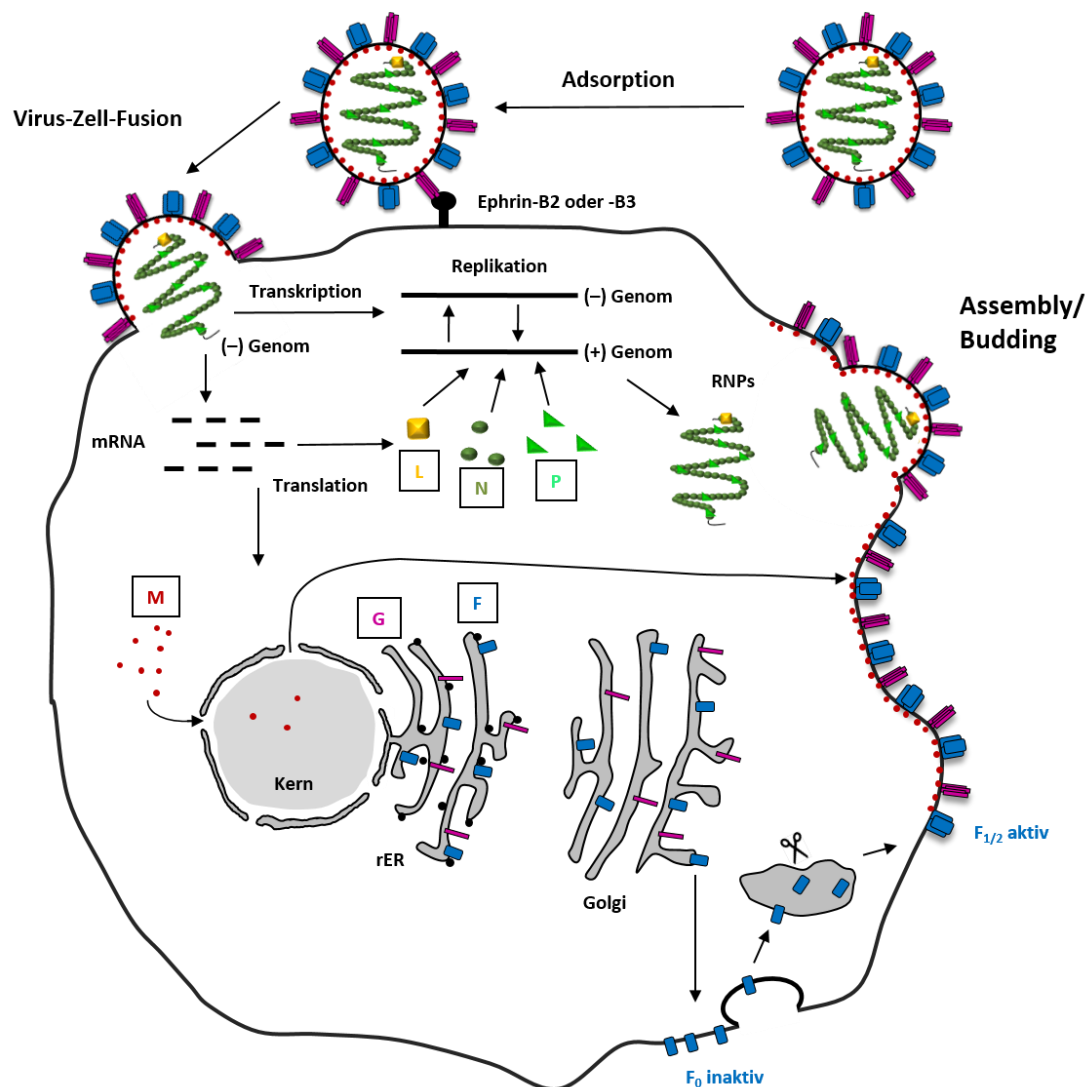


Abbildung I.2: Schematische Darstellung des NiV-Replikationszyklus.

1.5 Reverse Genetik

Funktionelle Untersuchungen zu viralen Proteinen werden oft an einzeln exprimierten Proteinen und deren Mutanten durchgeführt. Da hierbei alle anderen viralen Proteine fehlen, erlauben solche Expressionsuntersuchungen meist nur begrenzte Rückschlüsse auf die Virusinfektion. Um die Rolle von viralen Proteinen im Kontext einer NiV-Infektion untersuchen zu können, ist es nötig die viralen Gene innerhalb des kompletten Virusgenoms zu manipulieren und daraus ein replikationsfähiges Virus zu erzeugen. Hierfür nutzt man die reverse Genetik. Die Herstellung eines rekombinanten Nipahvirus wurde erstmals von Yoneda *et al.* (2006) beschrieben. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte Dr. Erik Dietzel nach einem ähnlichen Prinzip rekombinante Nipahviren generieren, die zum Beispiel ein zusätzliches eGFP-Gen enthalten, oder denen das Gen für das NiV-M vollständig fehlt (rNiVeGFP und rNiVΔM; Dietzel *et al.*, 2015). Bei dieser Methode wird ein sogenanntes Volle-Länge-Plasmid verwendet, das unter der Kontrolle eines T7-Promotors für die cDNA des kompletten NiV-Genoms kodiert (18246 bp). Abgeschlossen wird die genomische Sequenz durch eine Hepatitis δ -Ribozym-Sequenz vor dem T7-Terminationssignal. So wird ein korrektes 3' Ende der antigenomischen RNA gewährleistet. Um nun mit Hilfe des Volle-Länge-Plasmids ein rekombinantes Virus zu gewinnen, werden 293T-Zellen mit einem Modified-Vaccinia-Ankara-Virus infiziert, welches für die T7-Polymerase kodiert (MVA-T7). Nach der Infektion werden die Zellen mit dem T7-abhängigen Volle-Länge-Plasmid und verschiedenen Helferplasmiden transfiziert. Die Helferplasmide werden ebenfalls T7-abhängig exprimiert und kodieren für das NiV-N, -P und -L-Protein (Abb. I.3 A). Mit Hilfe der T7-Polymerase wird dann zum einen, ausgehend vom Volle-Länge-Plasmid, ein NiV-Antigenom und zum anderen, basierend auf den Helferplasmiden, die mRNA für die viralen Protein N, P und L gebildet. Diese mRNAs werden translatiert und dadurch enkapsidieren die vorhandenen N-, P- und L-Proteine sofort die neuen viralen Antigenome. Der Polymerase-Komplex transkribiert dann das Antigenom in ein virales Genom, das ebenfalls sofort enkapsidiert wird. Ausgehend von diesem NiV-Genom werden schließlich die verschiedenen mRNAs für die sechs NiV-Gene transkribiert. Ab diesem Schritt findet ein „normaler“ Replikationszyklus statt. Ist der sogenannte *virus rescue* geglückt, kommt es nach ausreichender Synthese aller Virusproteine, der erfolgreichen Replikation neuer

Virusgenome und der Bildung von infektiösen RNPs zum Assembly und der Freisetzung der neuen rekombinanten NiV an der Plasmamembran (Abb. I.3 B).

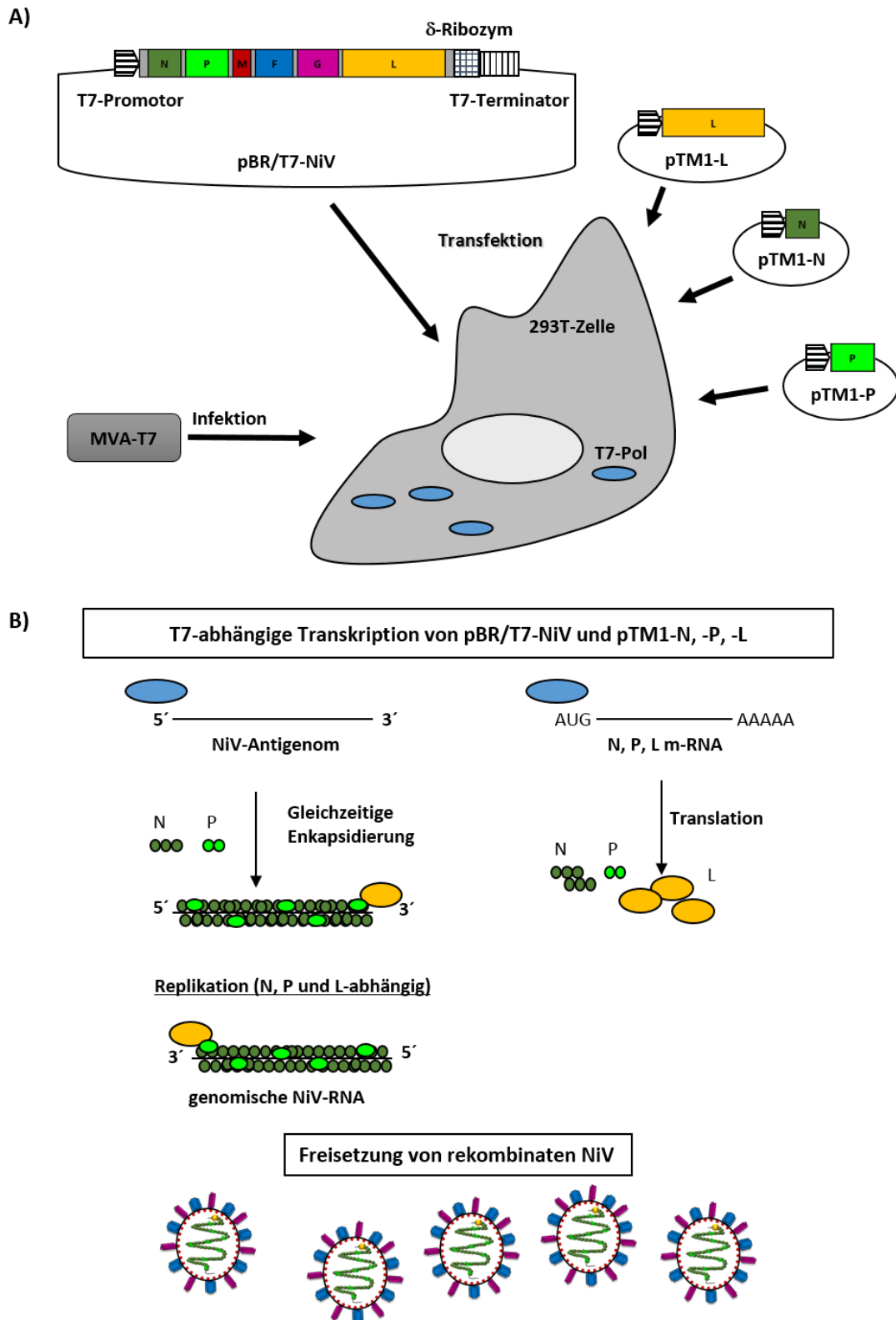


Abbildung I.3: Schematische Darstellung des reversen Genetik-Systems (modifiziert nach Frau Prof. Dr. A. Maisner 2002 Habilitationsschrift). (A) Infektion und Transfektion der 293T-Zellen mit MVA-T7 und dem Volle-Länge-Plasmid, pTM1-N, -P und -L. (B) Darstellung der T7-abhängigen Transkription von pBR/T7-NiV und pTM1-N, -P und -L.

1.6 Die Oberflächen-Glykoproteine

Die NiV-Glykoproteine G und F sind Bestandteile der Virushülle und bilden 12 nm lange *spikes*, die aus der Virushülle herausragen (Goldsmith *et al.*, 2003; Walpita *et al.*, 2011). Sie spielen eine essentielle Rolle beim pH-unabhängigen Eintritt des Virus in die Wirtszelle und bei der Zell-Zell-Fusion.

1.6.1 Das Glykoprotein (G)

Das NiV-Glykoprotein (G) ist ein Typ-II-Transmembranprotein, besteht insgesamt aus 602 Aminosäuren (AS) und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 67 kDa (Harcourt *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). NiV-G bildet über Disulfidbrücken Dimere, die zu teilweise kovalent verknüpften Tetrameren assoziieren und so auf der Oberfläche der Viruspartikel zu finden sind (Maar *et al.*, 2012). Das rezeptorbindende Glykoprotein ist essentiell für die Adsorption der Virionen an die Zelloberfläche und bindet an die zellulären NiV-Rezeptoren Ephrin-B2/-B3 (Bonaparte *et al.*, 2005; Negrete *et al.*, 2005; 2006). Es dient außerdem als Kofaktor bei der Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran und der Zell-Zell-Fusion von infizierten Zellen mit benachbarten rezeptortragenden Zellen (Tamin *et al.*, 2002).

1.6.2 Das Fusionsprotein (F)

Anders als das G-Protein ist das Fusionsprotein (F) ein Typ-I-Transmembranprotein. Es besteht aus 546 AS und besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 60 kDa (Harcourt *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Es wird als inaktiver Vorläufer F₀ im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Das F₀ wird zunächst über den sekretorischen Transportweg an die Plasmamembran transportiert und anschließend über ein YRS_L-Endozytose-Motiv internalisiert. Im Endosom wird es durch Cathepsin L/B an einer monobasischen Spaltstelle (Arginin 109) in seine beiden Untereinheiten F₁ und F₂ gespalten, wodurch es biologisch aktiv wird (Diederich *et al.*, 2005; Vogt *et al.*, 2005; Pager *et al.*, 2006; Diederich *et al.*, 2008; Diederich *et al.*, 2012). Dabei bleiben beide Untereinheiten über Disulfidbrücken miteinander verknüpft (Moll *et al.*, 2004). Erst nach dem Rücktransport von F_{1/2} zur Zellmembran ist ein fusionsaktives F-Protein für den Einbau in neue Viruspartikel verfügbar und es können Viren von der Zelle frei gesetzt werden, die neue Zellen infizieren können (Diederich *et al.*, 2008).

Während des NiV-vermittelten Fusionsprozesses kommt es nach der Rezeptorbindung des G-Proteins zu einer Konformationsänderung im G, die wiederum zu einer Konformationsänderung im F-Protein führt, wodurch erst die Verschmelzung der Virusmembran mit der Wirtszellmembran vermittelt werden kann (Chang und Dutch, 2012). Neben dieser, für den Viruseintritt in die Wirtszelle essentiellen Virus-Zell-Fusion, vermittelt das F-Protein, wie für Paramyxoviren üblich, auch die Zell-Zell-Fusion von infizierten mit nicht infizierten, benachbarten Zellen, was zur Ausbildung von mehrkernigen Synzytien führt (Tamin *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 2004). Diese Art der Zell-Zell-Fusion beeinflusst die Zytopathogenität des NiV und sorgt für eine schnelle Ausbreitung der Infektion auf benachbarte Zellen (Diederich *et al.*, 2008; Weise *et al.*, 2010). Dietzel *et al.* (2015) konnte mit Hilfe eines M-depletierten rekombinanten NiV (rNiVΔM) zeigen, dass beim Fehlen des Matrixproteins die Fusionsaktivität der NiV-Glykoproteine in infizierten Zellen deutlich erhöht ist. Dies lässt vermuten, dass die NiV-vermittelten Fusionsprozesse durch das M-Protein reguliert werden.

1.7 Die Nukleokapsid-Proteine

1.7.1 Das Nukleoprotein (N)

Das Nukleoprotein (N) hat eine Länge von 532 AS und ein Molekulargewicht von 58 kDa (Harcourt *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Wie bei allen Paramyxoviren kommt es durch die besondere Transkriptionsstrategie, entsprechend der Anordnung der Gene, zu einem mRNA-Gradienten, wodurch das N-Protein das am stärksten exprimierte virale Protein ist. Es enkapsidiert die virale RNA und ist verantwortlich für die Bildung des helikalen Nukleokapsids. Neben seiner strukturgebenden Funktion, spielt das N-Protein eine wichtige regulatorische Rolle während der Transkription und Replikation (Halpin *et al.*, 2004). Das N-Protein ist in zwei Regionen unterteilt, einen N-terminalen Teil, dem N_{Core}, der für die N-N Interaktion und die RNA-Bindung notwendig ist und einer C-terminalen Domäne, dem N_{Tail}, der die Interaktionsstelle mit dem Phosphoprotein enthält (Chan *et al.*, 2004; Habchi und Longhi, 2015). Nach der Synthese liegt das N-Protein entweder als monomerische, lösliche Form (N₀) oder als strukturierte Nukleokapsid-assoziierte Form vor (N_{NUC}; Tan *et al.*, 2004; Habchi und Longhi, 2015). Um das *self*-Assembly des N-Proteins zu verhindern fungiert das P-Protein als Chaperon und hält das N₀ im Zytoplasma zurück. Die hierdurch gebildeten N₀-P-Komplexe

enkapsidieren die neu entstandene, genomische RNA nach der Replikation. Anschließend bilden diese schon strukturierten Nukleokapside weitere Komplexe mit P und L. Dadurch entstehen die fertigen Nukleokapside (RNPs), die dann beim Virus-Assembly an der Plasmamembran in neu gebildete Viruspartikel inkorporiert und so freigesetzt werden (Halpin *et al.*, 2004).

1.7.2 Das Phosphoprotein (P)

Das Phosphoprotein (P) hat eine Länge von 709 AS und ein Molekulargewicht von 98 kDa, womit es im Vergleich zu P-Proteinen anderer Paramyxoviren sehr groß ist (Harcourt *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Die P-Proteine der Paramyxoviren sind ein essentieller Kofaktor der RNA-Polymerase (L), der notwendig ist, um das L-Protein an die N-enkapsidierte RNA zu rekrutieren und so das vollständige RNP zu bilden (Longhi, 2015). Die paramyxoviralen P-Proteine bestehen aus einer langen intrinsisch ungeordneten N-terminalen Region (P_{NTR}) und einer C-terminalen Region (P_{CTR}). Die P_{CTR} beinhaltet die Multimerisationsdomäne (P_{MD}) und die C-terminale X Domäne (P_{XD}), die für die Oligomerisierung des P-Proteins und die Interaktion mit der C-terminalen Domäne des N-Proteins (N_{Tail}) verantwortlich ist (Johansson *et al.*, 2003; Blocquel *et al.*, 2013; Habchi und Longhi, 2015). Neben dem Strukturprotein P kodiert das P-Gen noch für drei weitere Nichtstrukturproteine C, V und W. Henipavirus C-, V- und W-Proteine spielen, wie es schon für andere Paramyxoviren bekannt ist, eine wichtige Rolle im viralen Lebenszyklus und als Interferon-Antagonist (Park *et al.*, 2003; Habchi und Longhi, 2015).

1.7.3 Die RNA-Polymerase (L)

Die RNA-Polymerase (L für *large*) ist mit 2244 AS und einem molekularen Gewicht von 258 kDa das größte virale NiV-Protein (Harcourt *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L) benötigt zur Replikation oder Transkription zum einen eine durch das Phosphoprotein stabilisierte Form des L-Proteins (Habchi und Longhi, 2015). Zum anderen muss die RNA durch das N-Protein enkapsidiert sein, sodass der Polymerase-Komplex (P-L) durch die N-P-Interaktion an die RNA rekrutiert werden kann (Halpin *et al.*, 2004). Der Polymerase-Komplex ist sowohl für die Bildung von viraler RNA, mRNA, für die *capping*- und Methylierungs-Reaktionen der 5'-Enden als auch für die

Polyadenylierung der 3'-Enden der synthetisierten mRNAs verantwortlich (Harcourt *et al.*, 2001; Lamb und Parks, 2013).

1.8 Paramyxovirale Matrixproteine

Die Matrixproteine (M) der Paramyxoviren spielen bei der Virusfreisetzung eine Schlüsselrolle und sind somit nötig für die Entstehung infektiöser Viruspartikel. Die M-Proteine werden zwar im Zytoplasma synthetisiert, binden aber aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen effizient an zelluläre Membranen. Sie interagieren außerdem mit den RNPs und den zytoplasmatischen Bereichen der viralen Glykoproteine, sodass alle Bestandteile der neuen Viruspartikel an der Zelloberfläche akkumulieren und anschließend durch Budding als infektiöse Viruspartikel an der Plasmamembran freigesetzt werden können (Takimoto und Portner, 2004; Harrison *et al.*, 2010). Dabei besitzen die meisten M-Proteine eine intrinsische Budding-Funktion, die sich dadurch zeigt, dass sie auch in Abwesenheit aller anderen Virusproteine in der Lage sind, die Freisetzung von Virus-ähnlichen Partikeln (*virus-like particles*, VLP) zu induzieren. So genannte *late domain*-Motive innerhalb der M-Proteine haben oft eine wichtige funktionelle Bedeutung für diese intrinsische Budding-Funktion. *Late domains* in viralen M-Proteinen können mit zellulären Proteinen des ESCRT-Komplexes (*endosomal sorting complex required for transport*) interagieren und diese an den Ort der Virusfreisetzung rekrutieren. Dies unterstützt dann die Partikelfreisetzung nach außen und somit das Virus-Budding. Das Virus nutzt so die Fähigkeit dieser zellulären Proteine eine vom Zytoplasma weggerichtet Vesikelbildung zu induzieren (Chen und Lamb, 2008). Battisti *et al.* (2012) konnten durch Röntgen-Kristallographie und Kryoelektrotomographie die Kristallstruktur vom M-Protein des Newcastle Disease Virus (NDV) bestimmen (Abb. I.4 A). Aufgrund der starken Homologien in den konservierten Sequenzen der paramyxoviralen M-Proteine wird dieses Modell auch auf andere Matrixproteine innerhalb der Paramyxoviren angewendet. Dieses legt nahe, dass die M-Proteine große, kontinuierliche Regionen positiver Ladung und zahlreiche hydrophobe AS in einer Oberflächen-exponierten Lage beinhalten. Dieser Umstand ist wahrscheinlich für die Membranassoziation der M-Proteine verantwortlich (Abb. I.4 B). Das auf dem NDV-M basierende Konformationsmodell besagt außerdem, dass die M-Proteine als stabile Dimere vorliegen, welche sich über eine Dimer-Dimer-

Homooligomerisierung zu Pseudotetrameren an der Plasmamembran anordnen (Abb. I.4 B). Diese Dimer-Dimer-Interaktion scheint die Krümmung der Membran zu beeinflussen, die für die Freisetzung viraler Partikel notwendig ist (Battisti *et al.*, 2012).

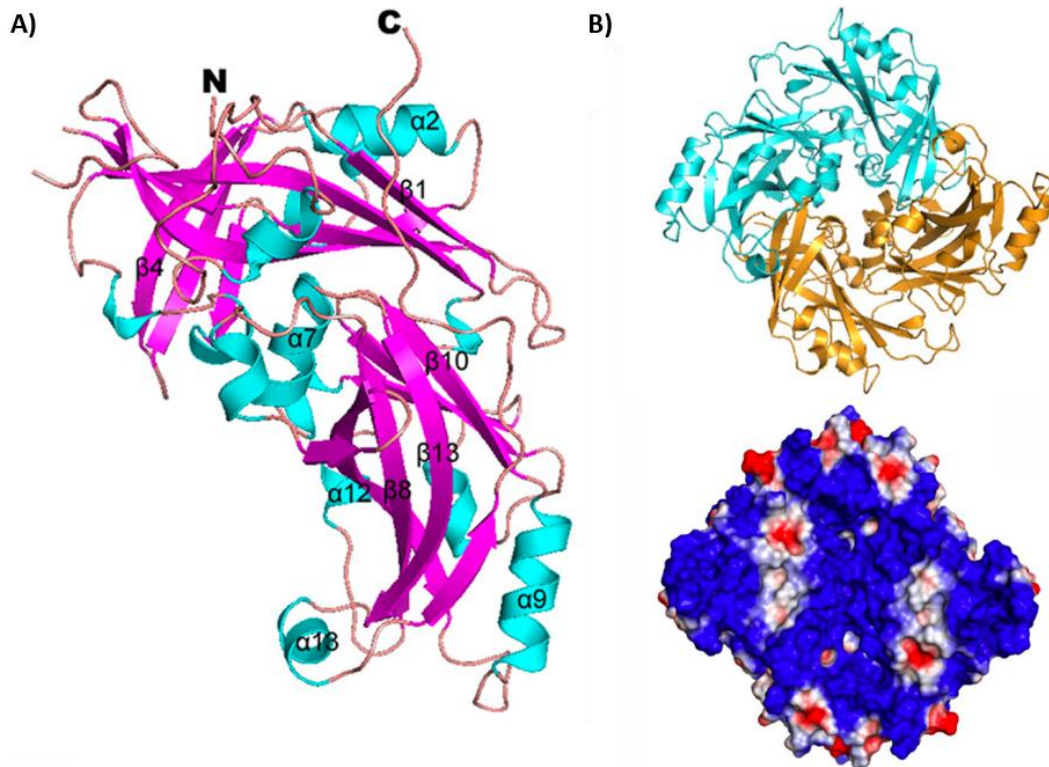


Abbildung I.4: Darstellung der NDV-M Struktur mittels Kryo-Elektrotomographie (aus Battisti *et al.*, 2012). (A) Das NDV-M Monomer besteht aus zwei ähnlich gefaltete β -Sandwich Domänen (magenta), die von einer Reihe α -Helices (cyan) flankiert werden. (B) Die beiden Monomere (cyan und gold) sind als Bändermodell dargestellt (oben). Die blauen Regionen in dem Kalottenmodell repräsentieren die positiven Ladungen, während die roten Regionen die negativen Ladungen darstellen (unten).

1.8.1 Das NiV-Matrixprotein

Das NiV-M besteht aus 352 AS und hat ein errechnetes Molekulargewicht von etwa 39 kDa (Harcourt *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Untersuchungen mit einem rekombinanten M-defizienten NiV (rNiV Δ M) haben bestätigt, dass das NiV-M notwendig für das Assembly und die Entstehung von infektiösen Viruspartikeln ist (Dietzel *et al.*, 2015). Obwohl es seine zentrale Funktion beim Virus-Assembly im Zytoplasma ausübt, wird das NiV-M nach der Synthese im Zytoplasma zunächst in den Kern importiert und wieder exportiert, bevor es ein funktionelles Assembly an der Plasmamembran einleiten kann (Wang *et al.*, 2010). Ein nicht funktioneller Kerntransit führt dazu, dass das NiV-M nicht an die Plasmamembran gelangt und das Budding nicht mehr induzieren kann

(Wang *et al.*, 2010). Warum das so ist und welche Rolle das NiV-M während seiner nukleären Phase spielt, ist ebenfalls völlig unverstanden.

Der M-Transportweg von der M-Synthese über die Kernphase bis hin zur finalen Akkumulation an der Zelloberfläche ist in Abbildung I.5 schematisch dargestellt. Um diesen komplexen intrazellulären Transport inklusive Kerntransit erfolgreich zu durchlaufen, besitzt das NiV-M einige mehr oder weniger gut charakterisierte Transportsignale. Im Folgenden soll auf die einzelnen Schritte im sogenannten M-Trafficking und die dafür notwendigen Signale und zellulären Interaktionspartner näher eingegangen werden.

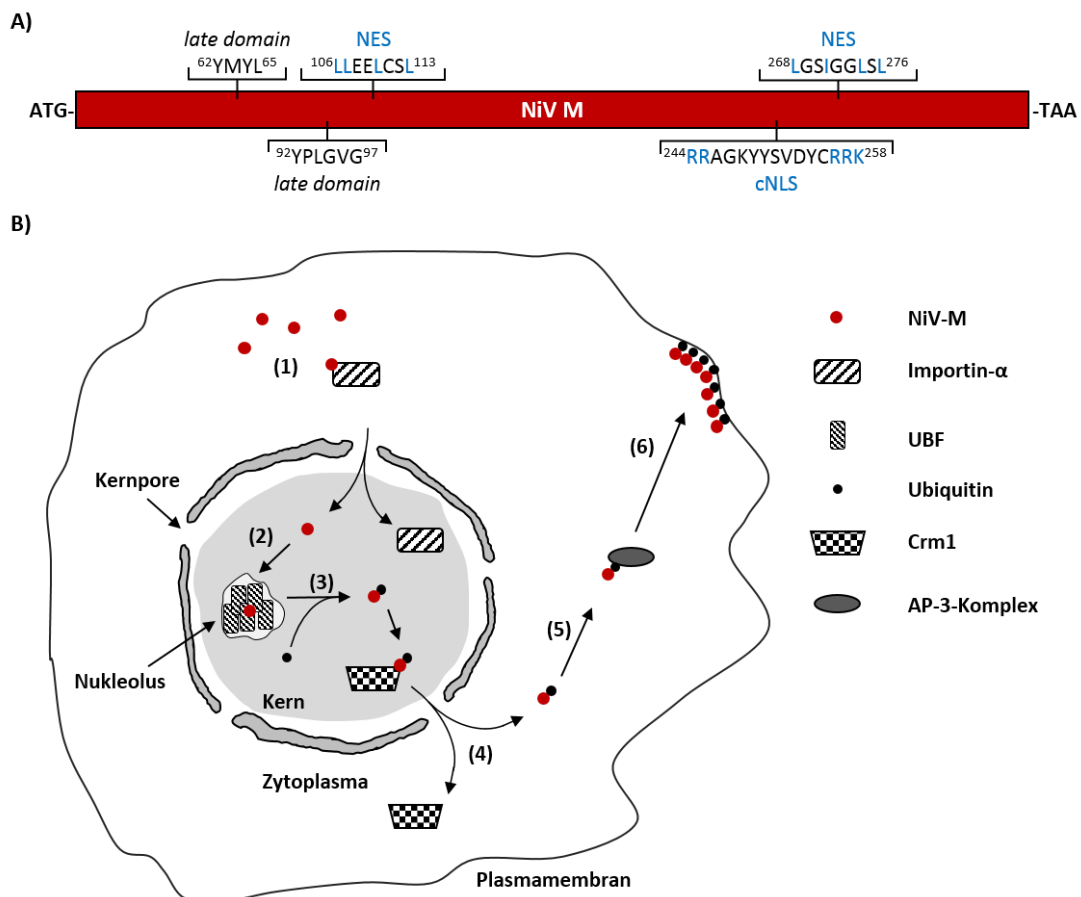


Abbildung I.5: Schematische Darstellung des NiV-Ms und sein intrazellulärer Transportweg (modifiziert nach Watkinson und Lee, 2016). (A) NES: *nuclear export signal*; cNLS: *classic nuclear import signal*. (B) Nach der Synthese im Zytoplasma wird das NiV-M über ein cNLS und Importin- α in den Zellkern importiert (1). Hier gelangt es dann in den Nukleolus (2) und wird anschließend im Zellkern am Lysin K258 ubiquitinyliert (3). Nach der Ubiquitinylierung wird das NiV-M über zwei NESs und Crm1-abhängig exportiert (4). Nach dem Export interagiert NiV mit dem AP-3-Komplex (5) und gelangt anschließend an die Plasmamembran (6).

Kernimport des NiV-Ms

Nach der M-Synthese an freien Ribosomen im Zytoplasma gelangt es in den Zellkern. Das Molekulargewicht von etwa 40 kDa stellt für ein M-Monomer das obere Limit für Proteine dar, die durch freie Diffusion den *nuclear pore complex* (NPC) überwinden können (Terry *et al.*, 2007). Da die strukturellen Ähnlichkeiten mit anderen Paramyxovirus M-Proteinen darauf schließen lassen, dass das NiV-M vorwiegend als Homodimer vorliegt, ist ein aktiver Kernimport wahrscheinlicher (Battisti *et al.*, 2012; Förster *et al.*, 2015). Mittels Massenspektroskopie-Analysen konnten auch bereits Mitglieder der Importin- α -Familie (Imp- α) als mögliche Interaktionspartner des NiV-Ms identifiziert werden (Pentecost *et al.*, 2015). Imp- α -Proteine können aufgrund der Interaktion mit Bestandteilen des NPC Kargo-Proteine in den Kern transportieren (Terry *et al.*, 2007). Essentiell für die Interaktion des Imp- α mit Kargo-Proteinen ist die Anwesenheit eines linearen AS-Motivs, welches zu einem der bekannten *classic nuclear localization signals* (cNLS) gehört (Kosugi *et al.*, 2009; Marfori *et al.*, 2011). Die Arbeitsgruppe um Behur Lee konnte im NiV-M auch zwei potentielle NLS auf Sequenzebene identifizieren. Allerdings ist nur die zweiteilige (*bipartite*) klassische NLS (cNLS) im Bereich der AS 244-258 für den Kernimport essentiell (Abb. I.5 A; Wang *et al.*, 2010; Pentecost *et al.*, 2015). Dieses zweiteilige cNLS-Motiv im NiV-M besteht aus zwei Clustern basischer AS, die durch 10-12 AS getrennt sind (vgl. Abb. I.2 A). Die Mutation des Lysins 258 zu Alanin (NiV-M_{K258A}) innerhalb des cNLS führte zu einem Block des Kernimports und beweist, wie wesentlich dieses Motiv für einen erfolgreichen Kernimport ist.

Kernexport des NiV-Ms

Während ein NiV-M mit einem Alanin an Position 258 (NiV-M_{K258A}) nicht mehr in den Kern gelangt, wird eine Mutante, in der das Lysin 258 gegen Arginin (NiV-M_{K258R}) ausgetauscht wurde, effizient in den Kern transloziert. Das belegt, wie wichtig die positive Ladung innerhalb des cNLS-Motives für den Kernimport ist (Wang *et al.*, 2010). Überraschenderweise akkumuliert die NiV-M_{K258R}-Mutante im Zellkern und wird nicht wie der Wildtyp NiV-M wieder in das Zytoplasma exportiert. Es stellte sich dabei heraus, dass im Nukleus an der Position 258 ein Ubiquitin-Rest angehängt werden muss, damit der Kernexport über die Exportsignale (NES) im M stattfinden kann (Wang *et al.*, 2010).

Diese Abhängigkeit des Kernexports von einer nukleären Ubiquitylierung kann auch bei anderen Paramyxovirus M-Proteinen, wie die des HeV, SeV und MuV, beobachtet werden (Pentecost *et al.*, 2015). Welche Rolle dabei das Ubiquitin genau spielt, ist noch völlig unklar. Basierend auf der Kristallstruktur des NDV-Ms (Battisti *et al.*, 2012) wurde zwar vermutet, dass das Ubiquitin kritisch für die Membranassoziation oder die Dimer-Dimer-Homooligomerisierung sein könnte, allerdings ist bisher unklar, was diese beiden Eigenschaften mit dem Kernexport zu tun haben könnten, für den an sich zwei Leucinreiche *nuclear export signals* (NES) verantwortlich sind (Abb. I.5 A; Wang *et al.*, 2010). Mutationen in den NES führten zur Retention des NiV-Ms im Zellkern. Ebenso kann eine Akkumulation des NiV-Ms im Zellkern durch den *chromosomal region maintenance 1* (Crm1)-Export Inhibitor Leptomycin B induziert werden. Dies legt nahe, dass die NES im NiV-M über eine Bindung an den Kernexportfaktor Crm1 den Transport aus dem Zellkern vermitteln. Diese Vermutung wird durch eine auf Proteomik-basierenden Interaktionsstudien von Bauer *et al.* (2014) gestützt. Hier kann das ANP32B, ein Crm1 Transport-Adapter-Protein für mRNA, als Interaktionspartner des NiV-Ms identifiziert werden (Bauer *et al.*, 2014; Pentecost *et al.*, 2015).

Transport des NiV-Ms an die Plasmamembran

Wie alle anderen Paramyxovirus M-Proteine assoziiert auch das NiV-M mit zellulären Membranen (Wang *et al.*, 2010). In Analogie zu anderen Matrixproteinen muss vermutet werden, dass die Membranassoziation vor allem über die Interaktion der positiv geladenen Oberflächen-exponierten AS mit den negativ geladenen Phospholipiden der Membranen vermittelt wird (vgl. Abb. I.4 B; Battisti *et al.*, 2012). Diese Membranassoziation spielt sicher eine wichtige Rolle beim Transport des NiV-Ms an die Plasmamembran. Von welchen zellulären Wirtsfaktoren dieser Transport weiter abhängt, ist allerdings noch weitestgehend unverstanden. Einen ersten wichtigen zellulären Wirtsfaktor konnten Sun *et al.* (2014) mit dem AP-3-Komplex identifizieren. Wird die Interaktion des AP-3-Komplexes, der in den vesikulären Transport zellulärer Membranproteine involviert ist (Dell'Angelica, 2009), mit dem NiV-M verhindert, so wird das NiV-M nicht mehr an die Plasmamembran transportiert und kann dort keine VLP-Bildung induzieren (Sun *et al.*, 2014).

Freisetzung von NiV-M an der Plasmamembran

Akkumuliert das NiV-M an der Plasmamembran und interagiert dort mit den viralen Glykoproteinen und den RNPs, dann leitet es über seine Budding-Funktion die Freisetzung neu gebildeter Viruspartikel ein. In der M-Einzelexpression führt diese Funktion zur Freisetzung von VLPs. Essentiell für die intrinsische Budding-Funktion sind zwei *late domains* mit den Motiven YMYL und YPLGVG im NiV-M (Abb. I.5 A; Ciancianelli und Basler, 2006; Patch *et al.*, 2007, 2008). Da virale *late domains* mit der zellulären ESCRT-Maschinerie interagieren, scheinen diese bei der Abschnürung neuer NiV-Viruspartikel eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Annahme konnte aktuell durch Park und Kollegen (2016) bestätigt werden, die gezeigt haben, dass die Interaktion von NiV-M mit Tsg101, einem wichtigen Bestandteil des ESCRT I-Komplexes (Wollert *et al.*, 2009), essentiell für die Freisetzung der Viruspartikel ist.

2. Das Zytoskelett

2.1 Bestandteile des Zytoskeletts

Das Zytoskelett erfüllt drei grundlegende Funktionen: es organisiert die intrazellulären Bestandteile, verbindet die Zelle physisch und biochemisch mit ihrer Umgebung und erzeugt eine koordinierte Kraft, sodass die Zelle in der Lage ist, sich zu bewegen und die Form zu variieren. Um diese Funktionen erfüllen zu können, nutzt das Zytoskelett die Aktivität einer Vielzahl an zytoplasmatischen Proteinen und Organellen. Das Zytoskelett wird in Mikrotubuli, Aktinfilamente und Intermediärfilamente unterteilt. Von diesen drei Polymeren sind die Mikrotubuli am unflexibelsten und haben ebenfalls die komplexeste Anordnungs- und Abbaudynamik. Sie werden aus α - und β -Tubulin-Dimere gebildet und ausgehend vom *microtubule-organizing-center* (MTOC) organisiert (Abb. I.6 A; Cooper und Hausman, 2009). Die Polymerisierung findet am (+)-Ende statt und ist zur Zellperipherie ausgerichtet. Während der Mitose bilden die Mikrotubuli den Spindelapparat und spielen eine essentielle Rolle bei der Sondierung der Chromosomen. Des Weiteren sind die Mikrotubuli mit zahlreichen anderen Proteinen (*microtubule associated proteins*; MAPs) für die Bildung von Flagellen und Zilien verantwortlich. Die bekanntesten Motorproteine, die eine Rolle im Transport entlang der Mikrotubuli spielen, sind Dynein und Kinesin. Die Mikrotubuli können zwischen zwei Formen

wechseln: dem stabilen Aufbau und dem schnellen Auflösen (Fletcher und Mullins, 2010).

Anders als die Mikrotubuli können die Aktinfilamente nicht zwischen zwei Formen wechseln, sondern sie polymerisieren bzw. depolymerisieren kontinuierlich, wodurch sie weniger starr sind. Durch die Aneinanderlagerung von monomerem oder globulärem G-Aktin polymerisieren diese zu filamentösem F-Aktin, das einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt (Abb. I.6 B; Wear *et al.*, 2000). Die Zusammenlagerung von kontraktilen Aktinfilamenten wird als *stress fibres* bezeichnet. Diese Dynamik spielt, ebenso wie die Motorproteine (Myosine), eine wichtige Rolle beim Proteintransport innerhalb der Zelle (Welch und Mullins, 2002).

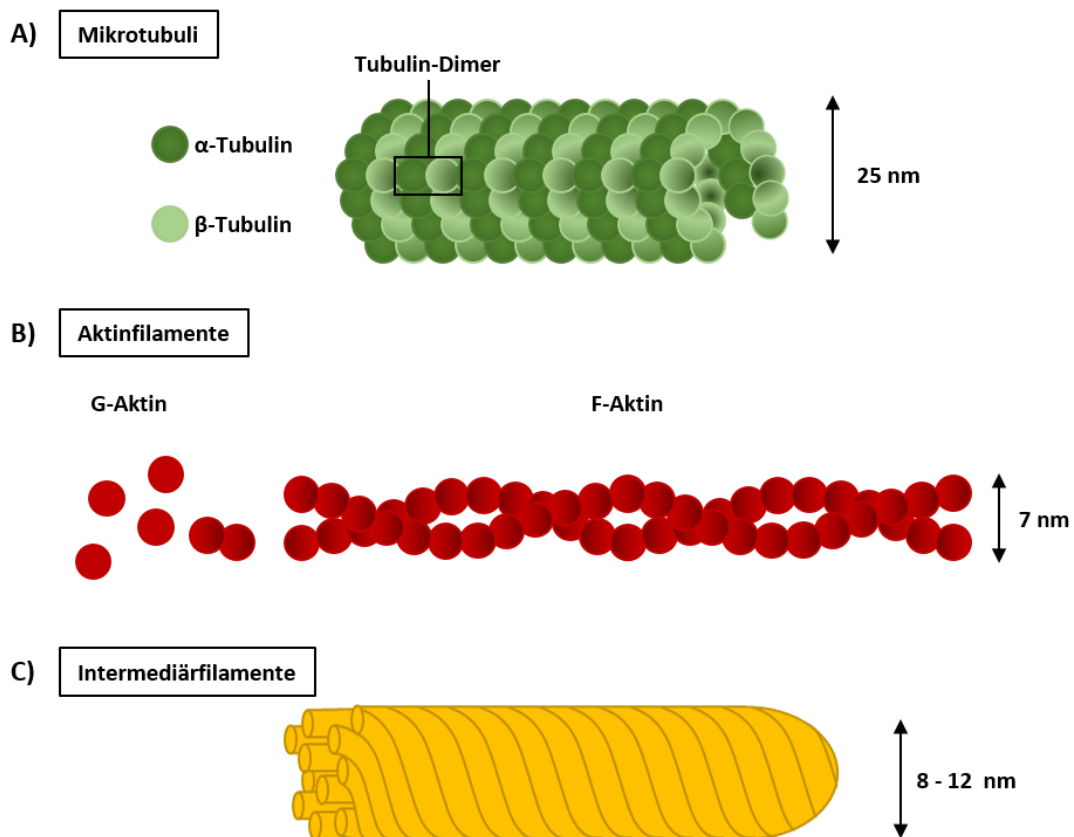


Abbildung I.6: Schematische Darstellung der Zytoskelett-Bestandteile. (A) α - und β -Tubulin bilden Dimere, diese Tubulin-Dimere dienen als Grundgerüst für die Mikrotubuli. (B) Das monomerische G-Aktin lagert sich aneinander an und polymerisiert so zum filamentösen F-Aktin. (C) Aufbau der Intermediärfilamente.

Intermediärfilamente sind die flexibelsten Polymere der drei Zytoskelett-Bestandteile (Abb. I.6 C). Je nach Zelltyp und Lokalisation bestehen sie aus Laminen, Keratinen, Desminen und Vimentinen. Sie vernetzen sich sowohl miteinander, als auch mit Aktin

oder den Mikrotubuli über sogenannte Plektine (Wiche, 1998). In vielen Zelltypen werden Intermediärfilamente als Antwort auf mechanischen Stress gebildet (Flitney *et al.*, 2009).

2.2 Rolle des Zytoskeletts in Virusinfektionen

In Untersuchungen mit verschiedenen Viren konnte gezeigt werden, dass Aktinfilamente und Mikrotubuli eine wichtige Rolle für die Freisetzung neuer Viruspartikel spielen. Eine wesentliche Aufgabe der Mikrotubuli während einer Virusinfektion ist der Langstrecken-Transport von viralen Proteinen, Nukleokapsiden und umhüllter Viren via Kinesin und Dynein (Goldstein *et al.*, 2000; Döhner *et al.*, 2005; Ward, 2011). Aktin kann wichtig sein für die Genom-Replikation, wie im Falle des humanen Parainfluenzavirus 3 (hPIV 3), bei dem intakte Aktinfilamente notwendig für die RNA-Synthese sind (Gupta *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu sind für den Assembly-Prozess des hPIV3 die Mikrotubuli wichtig (Takimoto *et al.*, 2004). Für Masern- und Hundestaupreviren (MV und CDV) wurde beschrieben, dass die Zerstörung des Aktinzytoskeletts mit Inhibitoren zu einer Verringerung der Virusfreisetzung führt (Katayama *et al.*, 2004; Klauschies *et al.*, 2010; Dietzel *et al.*, 2013). Dabei scheinen zumindest in MV-infizierten Zellen stabile Aktinfilamente essentiell für den intrazellulären Transport der viralen RNPs zur Plasmamembran zu sein, während der dynamische F-Aktinauf- und -abbau für den Budding-Prozess an der Plasmamembran notwendig ist (Dietzel *et al.*, 2013).

3. Fragestellung und Zielsetzung

Für das NiV-M konnte bisher gezeigt werden, dass es vor dem Erreichen der Plasmamembran einen Kerntransit durchlaufen muss (vgl. Abb. I.5). Erst danach kann es zur Plasmamembran transportiert werden, dort akkumulieren und das Assembly und Budding neuer Viruspartikel induzieren. Erste Beobachtungen innerhalb der Arbeitsgruppe weisen daraufhin, dass die Kernlokalisierung des NiV-Ms in unterschiedlichen Zelllinien variiert. Aus diesem Grund sollte im ersten Teil der Arbeit geklärt werden, inwieweit sich der nukleäre Transit des NiV-Ms in unterschiedlichen Zelltypen tatsächlich unterscheidet oder ob dieser in allen Zelltypen ein essentieller Transportprozess ist. Dazu sollte die Verteilung des NiV-M-Wildtyps und verschiedener Transport-defizienter NiV-M Mutanten in unterschiedlichen Zelltypen mittels konfokaler Immunfluoreszenzanalyse und *live cell imaging* untersucht werden.

Virale Nukleokapside (RNPs) akkumulieren in infizierten Zellen in großen zytoplasmatischen *inclusion bodies* (IB), die teilweise perinukleär vorliegen, aber auch in großen Mengen an der Plasmamembran zu finden sind. Obwohl klar ist, dass für ein funktionelles Assembly das NiV-M mit intrazellulären NiV-RNPs interagieren muss, ist unklar wie und wo das stattfindet und ob das M-Protein in den Transport oder die Bildung von IB in der Nähe der Plasmamembran involviert ist. Um den Einfluss vom NiV-M auf die Lokalisation der IB zu untersuchen, sollten die Nukleokapsidproteine N und P transient koexprimiert werden und die Verteilung der gebildeten IB in An- und Abwesenheit vom NiV-M untersucht werden. In diesen Studien sollten dann auch verschiedene M-Mutanten analysiert werden, um zu klären, inwieweit ein Transportdefekt im NiV-M die Bildung oder Verteilung der RNPs bzw. IB beeinflusst.

Im dritten Teil der Arbeit sollte die Rolle des Zytoskeletts für den Transport des NiV-Ms und der RNPs an die Plasmamembran untersucht werden. Dazu sollten Inhibitorstudien mit Cytochalasin D (Aktin-Inhibitor) oder Nocodazole (Mikrotubuli-Inhibitor) in transient N, P und M-exprimierenden Zellen durchgeführt werden.

Durch diese Arbeiten soll ein grundlegendes Verständnis über die zellulären Prozesse und die notwendigen funktionellen Bereiche in den Virusproteinen, die für einen erfolgreichen Plasmamembrantransport des NiV-Ms und der RNPs und eine effiziente Neubildung und Freisetzung infektiöser Nipahviren essentiell sind, gewonnen werden.

II. Ergebnisse

1. Untersuchung des Zelltyp-abhängigen Nipahvirus Matrixprotein-Transports

Das NiV-M wird in NiV-infizierten und NiV-M-transfizierten Zellen durch den Zellkern transportiert, bevor es an der Plasmamembran akkumuliert (Wang *et al.*, 2010; Pentecost *et al.*, 2015). Ob das NiV-M dabei eine nukleäre Funktion erfüllt ist bisher unbekannt. Beobachtungen innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten, dass sich die NiV-M-Menge im Zellkern in verschiedenen Zelllinien drastisch unterscheiden. Um zu klären, ob ein vergleichbarer nukleärer Transit des NiV-Ms in allen Zelltypen tatsächlich stattfindet, wurde das NiV-M in verschiedenen Zelllinien aus unterschiedlichen Spezies und Organen transient exprimiert. Hierfür wurden folgende Zelltypen verwendet: HeLa (humane Zervixzellen), Vero76 (Nierenepithelzellen aus Meerkatzen), A549 (humane alveoläre Lungenepithelzellen), PBMEC (*primary porcine brain microvascular endothelial cells*), MDCK (Nierenepithelzellen aus dem Hund) und Huh7 (humane Hepatomazellen). Alle Zelllinien wurden auf Deckgläschen (DG) ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit einem Expressionsplasmid transfiziert, welches für das NiV-M kodiert (pCG-NiV-M_{Kozak}; vgl. Kapitel IV.2.3). 24 Stunden (h) nach der Transfektion (*post transfection*, p.t.) wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit Methanol/Aceton (1:1) permeabilisiert. Für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse (vgl. Kapitel IV.4.1.1) wurden die Zellen dann mit einem NiV-M-spezifischen Peptidserum (IG1321) und einem AF 568-markierten anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Abbildung II.1 A und B zeigen, dass sich die Kernlokalisierung des NiV-Ms Zelltyp-abhängig unterscheidet. In HeLa-, Vero76-, A549-Zellen und PBMEC kann das NiV-M eindeutig im Kern detektiert werden (Abb. II.1 A). Im Gegensatz dazu ist in MDCK- und Huh7-Zellen keine Kernlokalisierung zu beobachten. Hier akkumuliert das NiV-M ausschließlich an der Plasmamembran (Abb. II.1 B). Somit zeigen sich zwei Phänotypen für die zelluläre Verteilung des NiV-Ms: Zellen, in denen NiV-M im Zellkern (HeLa, Vero76, A549 und PBMEC) und Zellen, in denen es nicht im Zellkern (MDCK und Huh7) lokalisiert ist. Für die weiteren Versuche wurden die Vero76-Zellen und die MDCK-Zellen exemplarisch für die beiden unterschiedlichen Phänotypen ausgewählt.

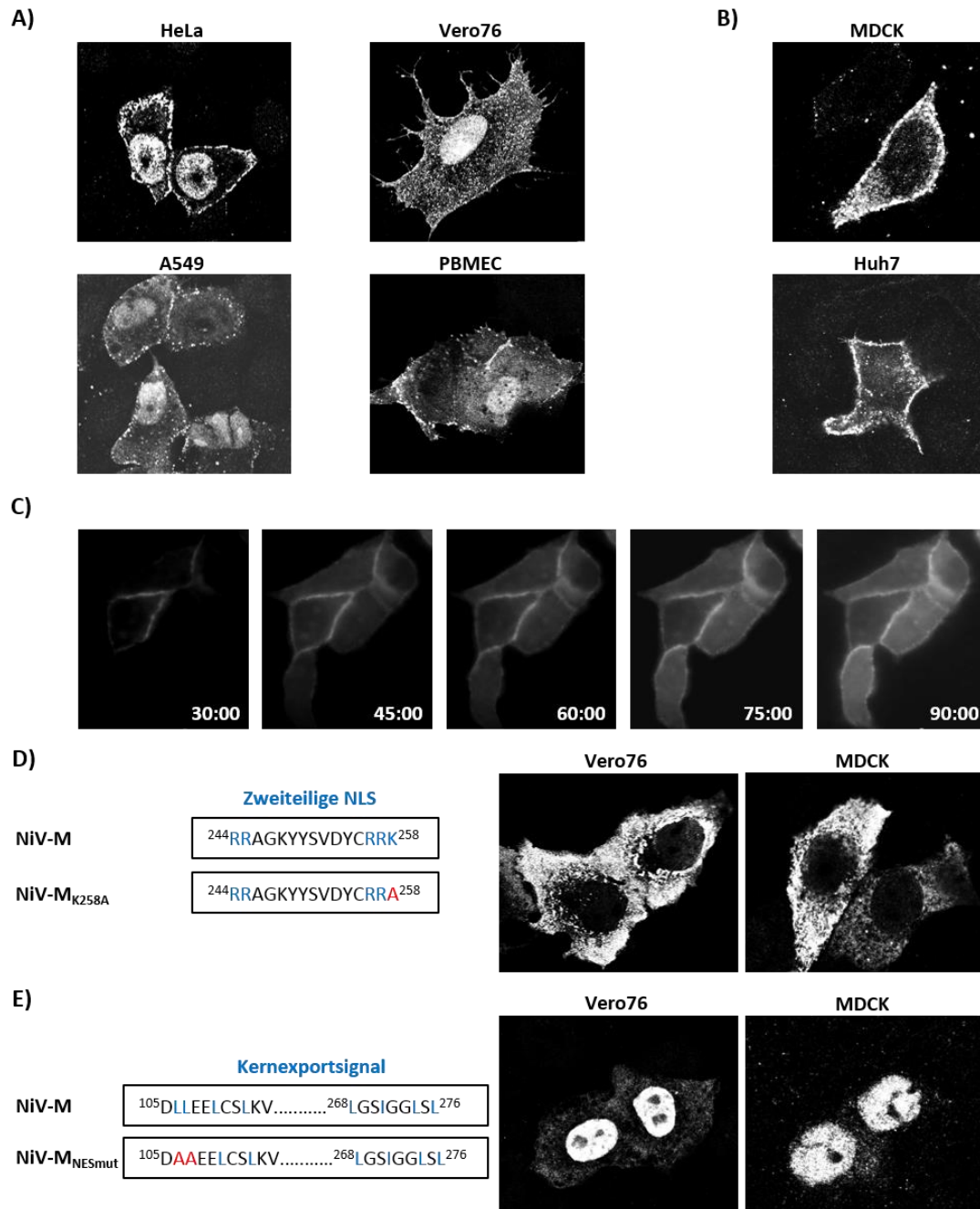


Abbildung II.1: Lokalisation von NiV-M und NiV-M-Mutanten in unterschiedlichen Zelllinien. (A,B) HeLa-, Vero76-, A549-Zellen und PBMEC und (B) MDCK- und Huh7-Zellen wurden auf DG ausgesät und mit LFA 2000 und pCG-NiV-M_{Kozak} transfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und mit Methanol/Aceton (1:1) permeabilisiert. Das NiV-M wurde durch einen Peptid-spezifischen Antikörper (IG1321) und einen AF 568-markierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärtantikörper detektiert. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (DPSS 561, Leica TCS SP5 II) und einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV-Objektiv aufgenommen. (C) Für die *live cell imaging*-Analyse wurden MDCK-Zellen auf μ -Dish^{35 mm} ausgesät und mit pCG-mCherry-linker-NiV-M transfiziert. 4 h p.t. wurde das Medium gewechselt (+Trolox) und die mCherry-Autofluoreszenz mit Hilfe eines Texas Red HYQ-Filter über 4 h alle 30 sec mit einem Nikon TE 2000 und einem Plan APO 60x Oil-Objektiv dokumentiert. (D) Sequenz des *nuclear import signals* (NLS) im NiV-M und der NiV-M_{K258A}-Mutante und die Lokalisation von NiV-M_{K258A} in transfizierten Vero76- und MDCK-Zellen. (E) Sequenz des *nuclear export signals* (NES) im NiV-M und die Lokalisation von NiV-M_{NESmut} in transfizierten Vero76- und MDCK-Zellen. Nachweise der M-Proteine wie oben beschrieben.

Um zu untersuchen, ob der nukleäre Transit in MDCK-Zellen vielleicht effizienter und schneller verläuft als in den anderen Zelllinien und deshalb in den *steady-state*-Analysen nicht detektiert werden kann, wurden *live cell imaging*-Analysen durchgeführt. Dies ermöglicht es, die NiV-M Verteilung in kurzen Zeitintervallen zu dokumentieren und somit auch einen schnelleren nukleären Transit zu beobachten. Hierfür wurden MDCK-Zellen auf μ -Dish^{35 mm} ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit pCG-mCherry-linker-NiV-M transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). 4 h p.t. erfolgte die Autoimmunfluoreszenzanalyse an einem *live cell imaging*-Mikroskop (Nikon TE 2000; vgl. Kapitel IV.4.2). In den in Abbildung II.1 C gezeigten Ausschnitten sieht man zu Beginn nur ein schwaches mCherry-NiV-M-Signal. Über einen Zeitverlauf von 90 min weisen immer mehr Zellen ein mCherryNiV-M-Signal auf, welches mit zunehmender Zeit an der Plasmamembran akkumuliert. Allerdings war auch anhand des *live cell imaging* keine Kernlokalisierung des mCherryNiV-M in MDCK-Zellen zu detektieren, sodass sich die Frage stellte, ob in diesen Zellen ein nukleärer Transit für die erfolgreiche Akkumulation an die Plasmamembran überhaupt notwendig ist. Um dies näher zu untersuchen, wurden in Anlehnung an die von Wang *et al.* (2010) publizierten Kernimport- (*nuclear localization signal*, NLS) bzw. Kernexport- (*nuclear export signal*, NES) Mutanten zwei Kerntransport-defiziente Mutanten des NiV-Ms kloniert (vgl. Kapitel IV.1.6). Zum einen wurde die Kernimport-Mutante NiV-M_{K258A} erzeugt, in welcher das NLS durch den Austausch des Lysins (K) 258 gegen Alanin (A) mutiert wurde (Abb. II.1 D). Außerdem wurde die Kernexport-Mutante NiV-M_{NESmut} hergestellt, in der das NES durch den Austausch zweier essentieller Leucine (L) gegen A zerstört wurde (Abb. II.1 E). Für Lokalisationsstudien der beiden Mutanten wurden auf DG ausgesäte Vero76- und MDCK-Zellen (vgl. Kapitel IV.2.2) mit pCG-NiV-M_{K258A} bzw. pCG-NiV-M_{NESmut} transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). 24 h p.t. wurden die Zellen fixiert und die mutierten M-Proteine durch das NiV-M-spezifische Peptidserum (IG1321) nachgewiesen (vgl. Kapitel IV.4.1.1). Wie in Abbildung II.1 D zu sehen, ist die Kernimport-Mutante M_{K258A} in beiden Zelltypen ausschließlich zytoplasmatisch verteilt und akkumuliert nicht mehr an der Plasmamembran. Somit scheint auch in MDCK-Zellen der nukleäre Transit essentiell für die M-Akkumulation an der Plasmamembran zu sein. Dies bestätigten auch die Untersuchungen des M_{NESmut}, welches nicht nur in Vero76-Zellen, sondern auch in MDCK-Zellen im Kern akkumuliert (Abb. II.1 E). Dies beweist eindeutig, dass ebenfalls in MDCK-Zellen das NiV-M vor einer Akkumulation an der

Plasmamembran durch den Kern transportiert wird, allerdings so schnell, dass es selbst im *live cell imaging* nicht beobachtet werden konnte.

Auch wenn in unseren Untersuchungen erhebliche quantitative Unterschiede in der nukleären Lokalisation des NiV-Ms in verschiedenen Zelltypen zu beobachten sind, haben die Lokalisationsstudien der Kerntransport-Mutanten gezeigt, dass der nukleäre Transit des M-Proteins in allen Zelltypen stattfindet und somit ein essentieller Transportprozess des NiV-Ms ist. Es gibt anscheinend keinen prinzipiellen Unterschied im nukleären Transit des NiV-Ms in den unterschiedlichen Zelllinien, sondern allenfalls Unterschiede in der Transport-Kinetik.

2. Einfluss des Nipahvirus-Matrixproteins auf die Lokalisation der *inclusion bodies* in der Infektion und im Kotransfektionssystem

Das Nipahvirus Matrixprotein (M) bindet an zelluläre Membranen, interagiert mit den Glykoproteinen an der Plasmamembran, sowie mit intrazellulären Nukleokapsiden (RNPs) und ist somit essentiell für die Entstehung infektiöser Viruspartikel. Unklar ist wo und wie das M mit den RNPs interagiert. Ebenfalls ist es bisher unbekannt, wie die RNPs an die Plasmamembran gelangen. Wichtige Hinweise auf diese Frage konnte kürzlich mit einem rekombinanten Nipahvirus gewonnen werden, dem das Gen für das M-Protein vollständig fehlt (rNiVΔM; Dietzel *et al.*, 2015). Dabei konnte gezeigt werden, dass diese rNiVΔM-Partikel eine unregelmäßige Morphologie aufweisen und oft mit Zellresten assoziiert sind. Ebenfalls reduziert die Abwesenheit des M-Proteins die Menge an neu synthetisierten infektiösen Viruspartikeln signifikant, obwohl sogar höhere Mengen an viraler RNA und viralen Nukleokapsid-Proteinen im Überstand von rNiVΔM-infizierten Zellen nachgewiesen wurden. Dies zeigt, dass das rNiVΔM einen deutlichen Assembly-Defekt aufweist. Es weist aber ebenfalls darauf hin, dass auch ohne die Bildung neuer Viren virale Nukleokapsid-Bestandteile von infizierten Zellen freigesetzt werden. Dabei ist bisher unklar, ob dies ein zufälliger Prozess, bedingt durch den cytopathischen Effekt (CPE) und die damit verbundene Freisetzung von Membran- bzw. Zellresten, ist oder, ob es einen M-unabhängigen RNP-Transport an die Plasmamembran gibt, wie es für den RNP-Komplex der Filoviren gezeigt werden konnte (Schudt *et al.*, 2013). Um die Frage zu klären, ob in der NiV-Infektion RNPs alleine an die Zelloberfläche gelangen, wurden

Vero76-Zellen auf DG ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und im BSL-4-Labor durch Laura Behner und Anja Heiner mit rNiVwt und M-defizienten rNiVΔM infiziert (vgl. Kapitel IV.3.2). 17 h nach der Infektion (*post infection*; p.i.) wurden die Zellen für 24 h mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) inaktiviert. Nach dem Ausschleusen der Proben aus dem BSL-4 mussten die infizierten Proben nochmal über Nacht in PFA inkubiert werden. Zur Immunfluoreszenzanalyse (vgl. Kapitel IV.4.1.2) wurden die Zellen dann mit einem NiV-M-spezifischen Peptidserum (IG1321) aus dem Kaninchen sowie einem NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (GP3), das vorallem das NiV-N erkennt, und AF 568- bzw. AF 488-markierten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Wie in Abbildung II.2 A zu sehen, findet man in rNiVwt-infizierten Zellen große, Plasmamembran-nahe sogenannte *inclusion bodies* (IB). Diese bilden sich typischerweise durch die Anhäufung viraler Nukelokapsidproteine und RNPs. Die IB an der Plasmamembran rNiVwt-infizierter Zellen zeigen eine deutliche Kolo-kalisation mit dem M-Protein. Im Gegensatz dazu akkumulieren die IB in rNiVΔM-infizierten Zellen, d.h. in der Abwesenheit von M, ausschließlich perinukleär. Die Infektionsstudien zeigen damit deutlich, dass es nur in der Anwesenheit vom M zu einer Lokalisation der IB an der Plasmamembran kommt.

Um zu klären, ob die Anwesenheit des viralen Genoms für die Lokalisation der RNPs bzw. der IB an der Plasmamembran notwendig ist, wie für Masernviren gezeigt (Liljeroos *et al.*, 2011), wurden die viralen Proteine N, P, F und G in An- und Abwesenheit von M in Vero76-Zellen transient koexprimiert (vgl. Kapitel IV.2.3). 24 h p.t. wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit Triton X-100 (TX-100) permeabilisiert. Für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen, wie oben beschrieben, mit M- und IB-spezifischen Peptidseren gefärbt (vgl. Kapitel IV.4.1.1). Die Koimmunfluoreszenzanalysen zeigen in Anwesenheit von M eine deutliche Kolo-kalisation von M und den IB an der Plasmamembran (Abb. II.2 B). Wird M nicht exprimiert, sind die IB nicht länger an der Plasmamembran, sondern ausschließlich perinukleär lokalisiert (Abb. II.2 B). Somit bestätigen die Transfektionsstudien eine M-abhängige Akkumulation der RNPs bzw. IB an der Plasmamembran und zeigen zudem, dass hierfür das virale Genom nicht erforderlich ist. Das ermöglicht die Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Transportprozesse im "Kotransfektionssystem". Dies ist in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben.

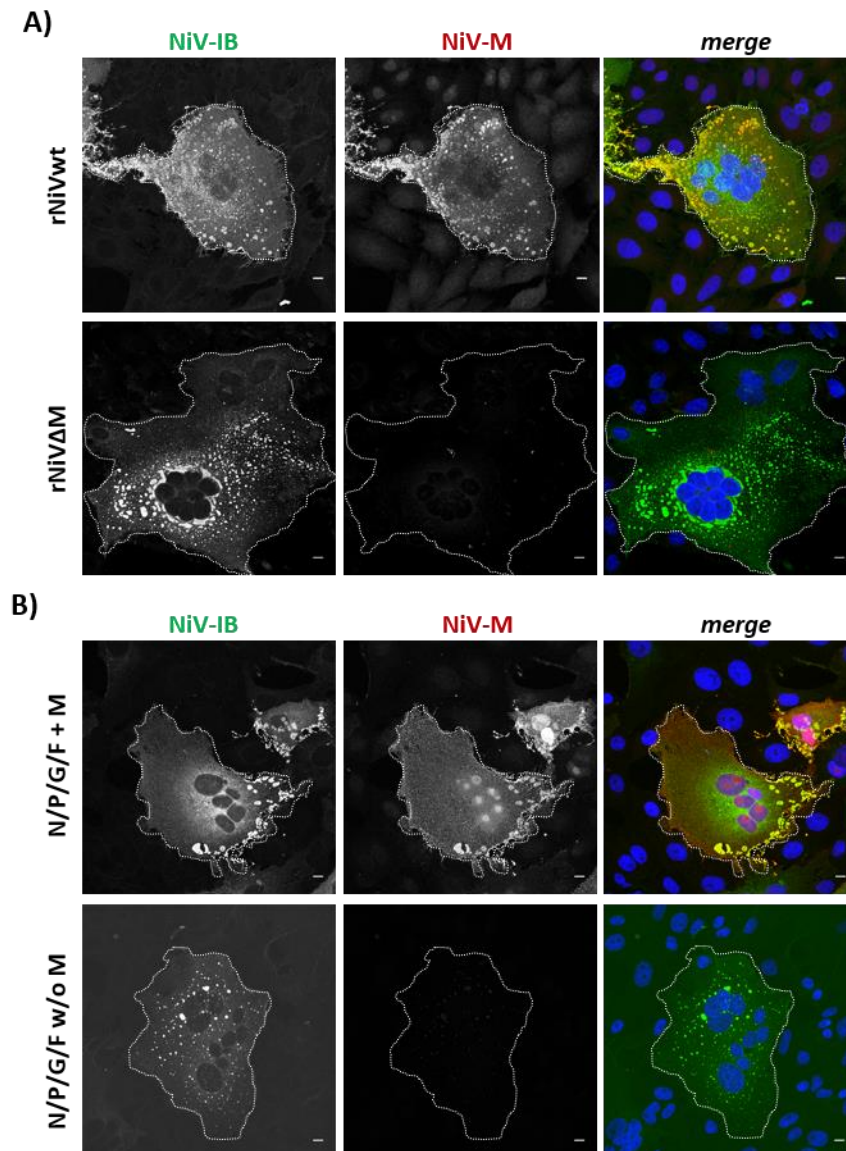


Abbildung II.2: Lokalisation von IB und M in rNiV-infizierten und kotransfizierten Vero76-Zellen. (A) Für die Infektionsstudien wurden Vero76-Zellen mit rNiVwt oder rNiVΔM mit einer MOI von 0,01 (rNiVwt) oder 0,025 (rNiVΔM) infiziert. 17 h p.i. wurden die Zellen mit 4 % PFA für 48 h inaktiviert und dann mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Das NiV-M wurde durch einen Peptid-spezifischen Antikörper (IG1321) und einen AF 568-markierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper, die NiV-IB wurden durch ein NiV-spezifisches Meerschweinenserum (GP3) und einen AF 488-markierten anti-Meerschweinchen-IgG-Sekundärantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Proben wurden am konfokalen Laserscanning Mikroskop (Argon-Laser, DPSS 561 und 405 Diode; Leica TCS SP5 II) mit einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV-Objektiv ausgewertet. (B) Für die Kotransfektionsstudien wurden Vero76-Zellen mit LFA 2000 und pCG-MCS-NiV-N/-P, pCG-NiV-G_{HA}, pCAGGS-NiV-F und pCG-NiV-M_{Kozak} transfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Nachweise der NiV-Proteine wie oben beschrieben. Gezeigt sind Maximalprojektionen von Stapelaufnahmen der infizierten und transfizierten Zellen (16-31 z-Schnitte). Maßstabsbalken: 10 μm.

3. Kolokalisation von NiV-IB mit zellulären Kompartimenten

Um zunächst zu klären, ob die IB an oder in einem bekannten zellulären Kompartiment akkumulieren oder ein eigenes intrazelluläres Kompartiment bilden, wurden die IB-bildenden Nukleokapsidproteine N und P koexprimiert. Dazu wurden Vero76-Zellen auf DG ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit pCG-MCS-NiV-N sowie pCG-MCS-NiV-P oder pCG-MCS-NiV-P_{eGFP} transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3) und anschließend Kolokalisationsstudien mit Markerproteinen für bekannte zelluläre Kompartimente durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h p.t. mit PFA fixiert und mit 0,1 % TX-100 permeabilisiert. Der Nachweis der IB erfolgte über ein NiV-spezifisches Meerschweinchenserum (GP3) und einen AF 488-markierten Sekundärantikörper oder über die eGFP-Autofluoreszenz am NiV-P_{eGFP}. Zur Färbung der zellulären Kompartimente wurden die Zellen mit dem jeweiligen Kompartiment-spezifischen Primärantikörper und einem AF 568-markierten Sekundärantikörper inkubiert, wie in Kapitel IV.4.1.3 beschrieben. Wie in Abbildung II.3 zu sehen ist, kolokalisieren die IB weder mit dem frühen (kleine zytoplasmatische Vesikel) noch dem späten (kleine perinukleäre Vesikel) Endosomen. Sie zeigen ebenfalls keine Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Peroxisom. Sie induzieren auch keine Stressantwort in der Zelle und akkumulieren deshalb auch nicht mit G3BP. Somit scheint es, als wenn die IB ein eigenes intrazelluläres Kompartiment bilden.

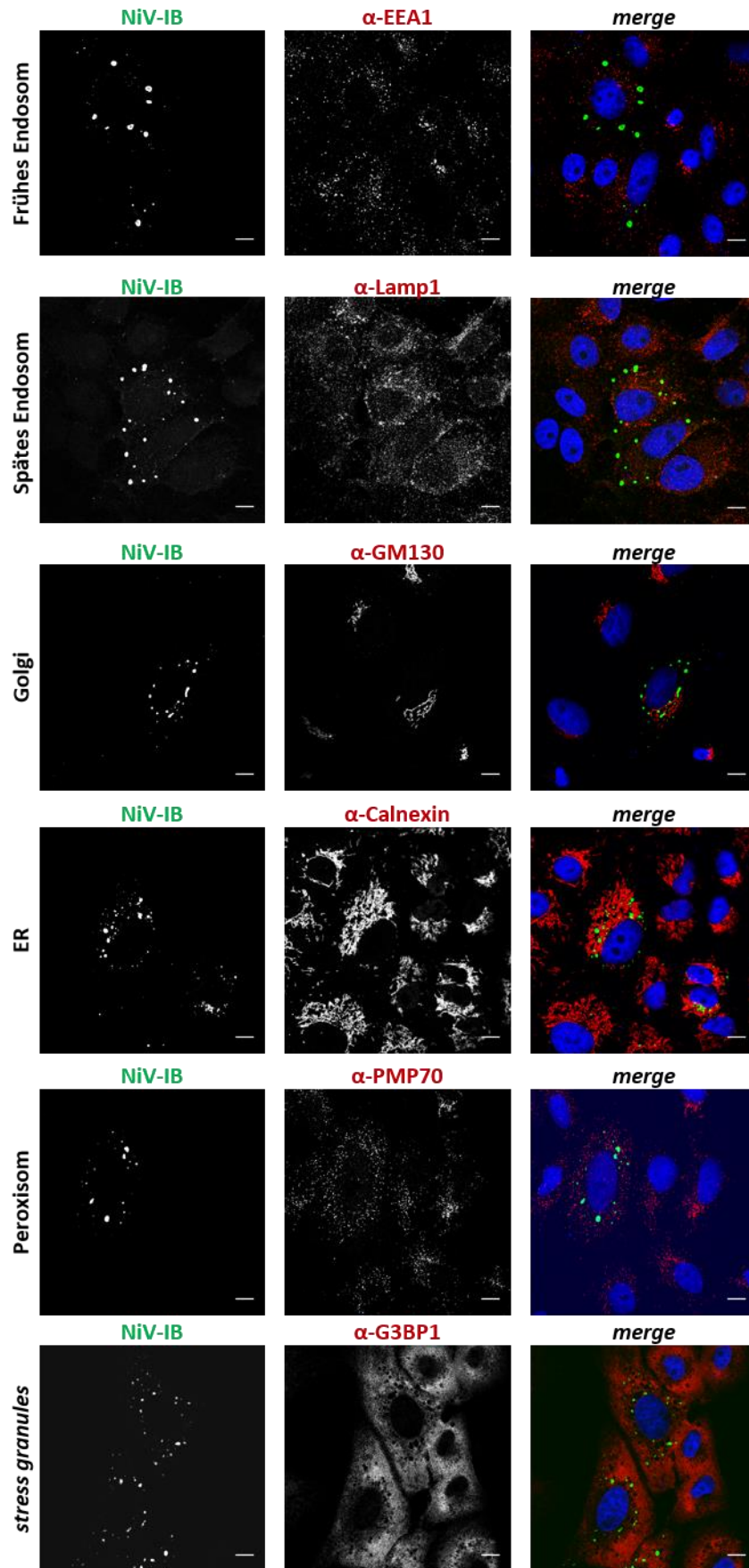


Abbildung II.3: Kolokalisation von NiV-IB mit zellulären Kompartimenten. Vero76-Zellen wurden

auf DG ausgesät und mit LFA 2000 und pCG-MCS-NiV-N und pCG-MCS-NiV-P (frühes und spätes Endosom) oder pCG-MCS-NiV-P_{eGFP} (Golgi, ER, Peroxisom und *stress granules*) transfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Zum Nachweis der zellulären Kompartimente wurden die Zellen mit den angegebenen Kompartiment-spezifischen Primärantikörper und AF 568-markierten anti-Maus-/bzw. Kaninchen-IgG Sekundärantikörpern behandelt (IV.4.1.4). Die NiV-IB wurden durch ein NiV-spezifisches Meerschweinchen Serum (GP3) und einen AF 488-markierten anti-Meerschweinchen-IgG-Sekundärantikörper oder über die Autofluoreszenz des eGFP-tags am NiV-P_{eGFP} visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Analyse der Immunfluoreszenzen erfolgte mit einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV-Objektiv an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Argon-Laser, DPSS 561 und 405 Diode; Leica TCS SP5 II). Maßstabsbalken: 10 µM.

4. Charakterisierung der M-abhängigen Lokalisation der IB an der Plasmamembran

4.1 Die periphere Formierung von großen IB ist unabhängig von den viralen Oberflächen-Glykoproteinen

Um die M-abhängige IB-Lokalisation an der Plasmamembran näher zu charakterisieren, wurde in den folgenden Kapiteln untersucht, welche Faktoren hierfür notwendig sind. Da bekannt ist, dass die NiV-Glykoproteine F und G unabhängig vom M an die Zellmembran transportiert werden (Weise *et al.*, 2010; Diederich *et al.*, 2012), sollte zunächst die Frage geklärt werden, inwieweit die NiV-Glykoprotein-abhängige Zell-Zell-Fusion (Synzytienbildung) bei der IB-Lokalisation eine Rolle spielt. Um dies zu testen wurden Lokalisationsstudien von N, P und M in Abwesenheit der beiden Glykoproteine F und G durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen transfiziert und 24 h p.t. mit PFA fixiert und mit TX-100 permeabilisiert. Für die Immunfluoreszenzanalysen (vgl. Kapitel IV.4.1.1) wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, gefärbt (Primärantikörper IG1321 und GP3, AF 568-/bzw. AF 488-markierten Sekundärantikörper). Wie in Abbildung II.4 A zu sehen, ist das M-Protein auch ohne die Synzytienbildung in der Lage die IB zu relokalisieren. Wenn das M exprimiert wird, kommt es in Anwesenheit des M-Proteins auch ohne die G/F-vermittelte Synzytienbildung zu einer IB-Lokalisation an der Plasmamembran. In der Abwesenheit vom M, akkumulieren die IB ausschließlich perinukleär (Abb. II.4 A, untere Reihe). Somit beeinflusst die Synzytienbildung weder die Bildung der IB, noch die Lokalisation der IB an der Plasmamembran oder die Kolo-kalisation vom M mit den IB.

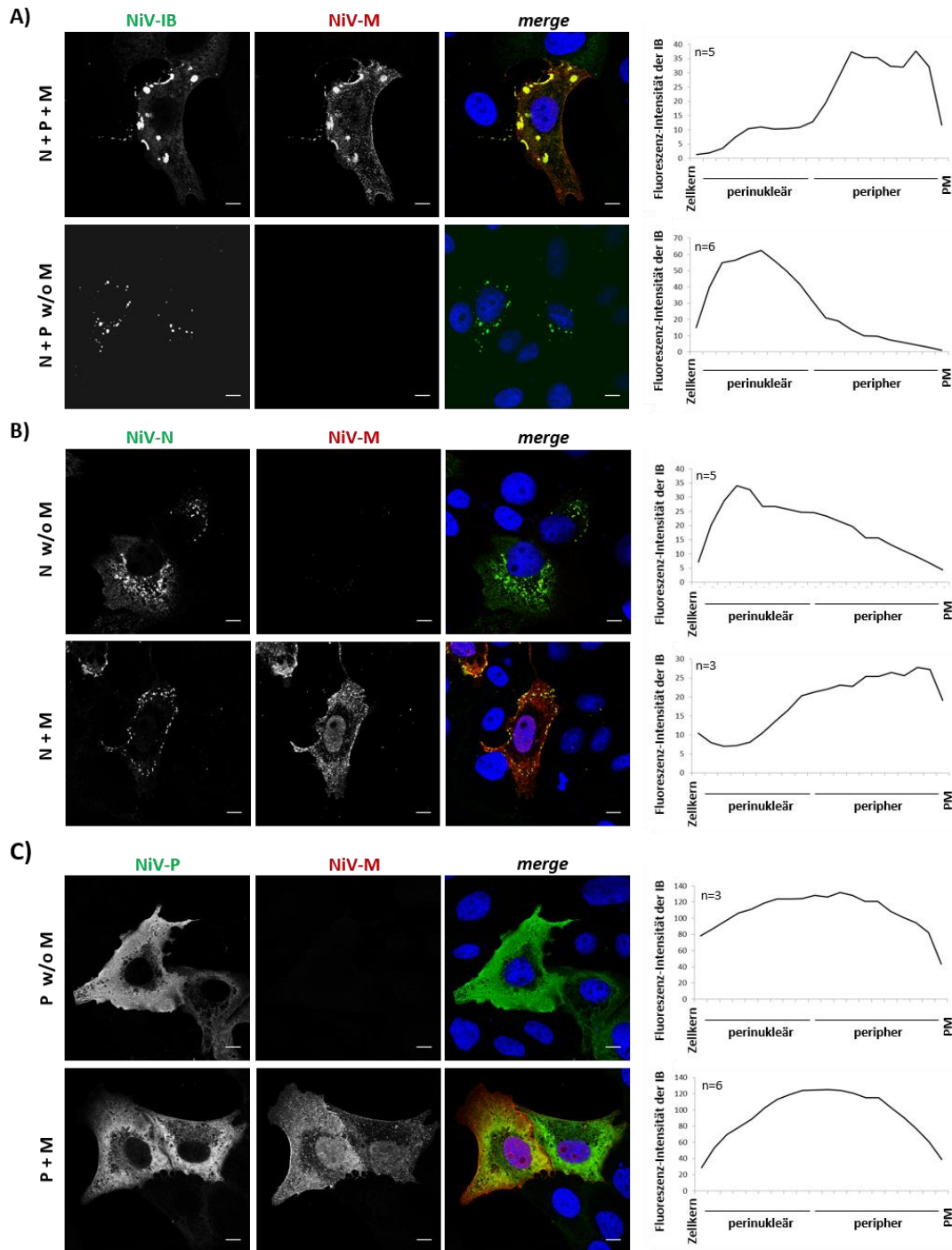


Abbildung II.4: Kolokalisationsstudien von NiV-N, NiV-P und NiV-M. Vero76-Zellen wurden auf DG ausgesät und mit (A) pCG-MCS-NiV-N/P und pCG-NiV-M_{Kozak}, (B) pCG-MCS-NiV-N und pCG-NiV-M_{Kozak} und (C) pCG-MCS-NiV-P und pCG-NiV-M_{Kozak} transfiziert (LFA 2000). 24 h p.t wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Das NiV-M wurde durch einen Peptid-spezifischen Antikörper (IG1321) und einen AF 568-markierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper und NiV-N und NiV-P durch ein NiV-spezifisches Meerschweinchenserum (GP3) und einen AF 488-markierten anti-Meerschweinchen-IgG-Sekundärantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Proben wurden am konfokalen Laserscanning Mikroskop (Argon-Laser, DPSS 561 und 405 Diode; Leica TCS SP5 II) mit einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV-Objektiv ausgewertet. (Graphen) Für die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität wurde ein von S. Halwe entwickeltes ImageJ-Makro (NukLoM) verwendet (siehe IV.4.1.6). IB: inclusion bodies; PM: Plasmamembran. Maßstabsbalken: 10 µM.

Um die Lokalisation der IB zu quantifizieren, hat Sandro Halwe (Institut für Virologie, Marburg) in Anlehnung an Yacovone *et al.* (2016) ein Makro, basierend auf der *open-source*-Software ImageJ, entwickelt („Nukleokapsid-Lokalisations-Makro“; NukLoM; vgl. Kapitel IV.4.1.6). Mit NukLoM werden zunächst der Zellkern und die Plasmamembran einer Zelle festgelegt („Zellmaske“). Anschließend werden zwischen 500 und 800 direkte Linien von der Kernmembran zur Plasmamembran gezogen. Entlang dieser Linie wird quantifiziert. Durch die Mittelung der Fluoreszenzverteilung auf allen Linien in einer Zelle, kann man dann eine quantitative Aussage darüber treffen, ob die Fluoreszenz, d.h. die IB, in einer Zelle vornehmlich perinukleär oder peripher vorliegen. In Abbildung II.4 A sieht man, dass sich in den Zellen, welche die IB zusammen mit dem M-Protein koexprimieren, die höchste IB-Fluoreszenzintensität in der Zellperipherie befindet, während in der Abwesenheit vom M die Fluoreszenz der IB im perinukleären Bereich am höchsten ist. Diese Quantifizierungen bestätigen somit eindeutig die Bedeutung des M-Proteins für die Lokalisierung der IB in der Zellperipherie, d.h. in der Nähe der Plasmamembran.

Als nächstes sollte geklärt werden, welches der beiden RNP-Proteine, N oder P, mit dem Matrixprotein interagiert. Deshalb wurde die Lokalisation des N- und P-Proteins jeweils in der Einzel- und in der Koexpression mit dem M untersucht. In der Einzelexpression ist das N-Protein in kleinen N-Dots lokalisiert, die hauptsächlich perinukleär in der Zelle verteilt sind. Bei der Koexpression vom M und N akkumulieren die N-Dots häufiger an der Plasmamembran, wo sie auch mit dem M kolokalisieren (Abb. II.4 B). Im Gegensatz zu N ist das P sowohl in der Einzel- als auch in der Koexpression mit dem M ausschließlich diffus zytoplasmatisch verteilt und es ist keinerlei Kolokalisation vom M und P zu beobachten (Abb. II.4 C). Diese Ergebnisse bestätigen die Studie von Ray *et al.* (2016), in der gezeigt wurde, dass das M mit N interagiert. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Akkumulation der IB an der Plasmamembran von der M-N Interaktion abhängt. Da aus den *steady-state*-Analysen nicht eindeutig hervor geht, ob sich die großen IB erst an der Plasmamembran formieren oder perinukleär gebildet werden und dann an die Plasmamembran gelangen, wurden *live cell imaging*-Studien durchgeführt. Dazu wurden Vero76-Zellen auf μ -Dish^{35 mm} ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit FuGENE HD und NiV-N, NiV-P_{eGFP}, mCherryNiV-M und NiV-M exprimierenden Plasmiden transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). 6,5 h oder 14 h p.t. folgte die Autoimmunfluoreszenzanalyse an

einem *live cell imaging*-Mikroskop (Nikon TE 2000; vgl. Kapitel IV.4.3). In Abbildung II.5 A sind fünf Einzelaufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt. Hier lässt sich erkennen, dass das N und P zunächst kleine, dann etwas größere IB bilden, die diffus in der Zelle lokalisiert sind. Im vollständigen *live cell*-Video (Einzelaufnahmen alle 30 sec) erkennt man, dass über die Zeit die kleinen IB miteinander zu größeren IB „verschmelzen“. In der Anwesenheit vom M werden zusätzlich zu den kleinen IB im Zytoplasma IB an der Plasmamembran gebildet, welche über die Zeit immer größer werden (Abb. II.5 B, Pfeil). Die *live cell imaging*-Studien bestätigen die M-abhängige Bildung der großen IB in der Peripherie, welche in den *steady-state*-Analysen beobachtet werden konnte. Es konnte allerdings nicht geklärt werden, ob die kleineren perinukleären IB „Vorstufen“ der Plasmamembran-nahen peripheren IB sind.

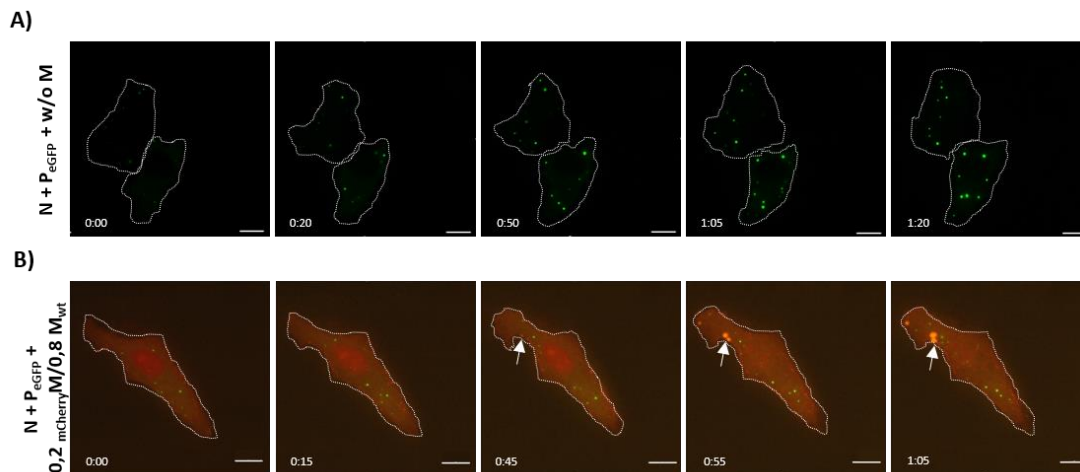


Abbildung II.5: *Live cell imaging*-Studien zur IB-Bildung. Vero76-Zellen wurden auf μ -Dish³⁵ mm ausgesät und mit FuGENE HD und (A) NiV-N und NiV-P_{eGFP} oder (B) mCherryNiV-M, NiV-M, NiV-N und NiV-P_{eGFP} (siehe IV.4.3) transfiziert. 6,5 h p.t. (A) oder 14 h p.t. (B) wurde das Medium gewechselt (+Trolox) und das *live cell*-Experiment gestartet. Dafür wurde die GFP-/mCherry-Autofluoreszenz mit Hilfe eines GFP HQ-Filter oder eines Texas Red HYQ-Filter über 4 h alle 30-50 sec mit einem Nikon TE 2000 und einem Plan APO 60x Oil-Objektiv dokumentiert. Maßstabsbalken: 10 μ M.

4.2 Struktur-Analysen der IB mittels Elektronenmikroskopie

Um zu untersuchen, ob die Lokalisation der IB einen Einfluss auf deren Struktur hat, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden N, P_{eGFP} und M in Vero76-Zellen transient exprimiert (vgl. Kapitel IV.2.3). 24 h p.t. wurden die Zellen fixiert und anschließend für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) vorbereitet (vgl. Kapitel IV.4.4). Hierfür wurden die Proben mit 4 % PFA und 0,2 % Glutaraldehyd in 0,1 M PHEM-Puffer für 30 min bei RT fixiert und abgekratzt.

Anschließend wurden die Zellen pelletiert und mit 4 % PFA überschichtet. Die weiteren Schritte des Einbettens, der Präparation der Ultradünnschnitte, der Negativ-Kontrastierung mit Uranylacetat, sowie der EM-Analyse wurden von Dr. Larissa Kolesnikova durchgeführt. In Abbildung II.6 A-C sind EM-Aufnahmen eines Ultradünnschnittes einer N/P_{eGFP}-transfizierten Zelle gezeigt. In dieser Zelle ist in der perinukleären Region ein NiV-IB zu erkennen (Abb. II.6 A-C, blaue Umrandung), wie es auch in NiV-infizierten Zellen gezeigt werden konnte (Goldsmith *et al.*, 2003; Lamp *et al.*, 2013). Dabei stellen die IB die Akkumulation von helikalen Nukleokapsid-ähnlichen Strukturen dar, die in der höheren Vergrößerung besser zu sehen sind (Abb. II.6 C, blaue Pfeile). Weiter kann man in Abbildung II.6 C deutlich die Ribosomen bzw. Polysome (schwarze Pfeile) an der Grenze der IB erkennen (blaue Umrandung). Wenn das M mit dem N und P koexprimiert wird, sieht man in den EM-Aufnahmen ein IB in der perinukleären Region (Abb. II.6 D, obere blaue Umrandung) und eine weniger elektronendichtere IB-Struktur unterhalb der Plasmamembran (Abb. II.6 D, untere blaue Umrandung). Dabei sind sowohl in dem perinukleären, als auch in dem peripheren IB helikale Nukleokapsid-ähnliche Strukturen zu erkennen (Abb. II.6 E und F; blaue Pfeile). Allerdings scheint die Struktur des peripheren IB nicht so dicht zu sein, wie die des perinukleären IB, was auf eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung schließen lässt (Abb. II.6 E und F; blaue Kreise). Weiter ist in NiV-M exprimierenden Zellen die Ausbildung einer dichten „Matrix“ an der Plasmamembran zu erkennen, die ohne das NiV-M nicht beobachtet werden konnte (Abb. II.6 B und F; rote Pfeile).

Zusammenfassend zeigen die EM-Analysen, dass perinukleäre und periphere IB unterschiedliche Strukturen aufweisen. Außerdem sind die weniger elektronendichten IB unterhalb der Plasmamembran nur in Anwesenheit von NiV-M zu finden, während sich die elektronendichten perinukleären IB auch ohne NiV-M bilden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die beiden IB-Subpopulationen (perinukleär/peripher) unabhängige Strukturen sind und die perinukleären IB wahrscheinlich keine „Vorstufe“ der peripheren IB darstellen.

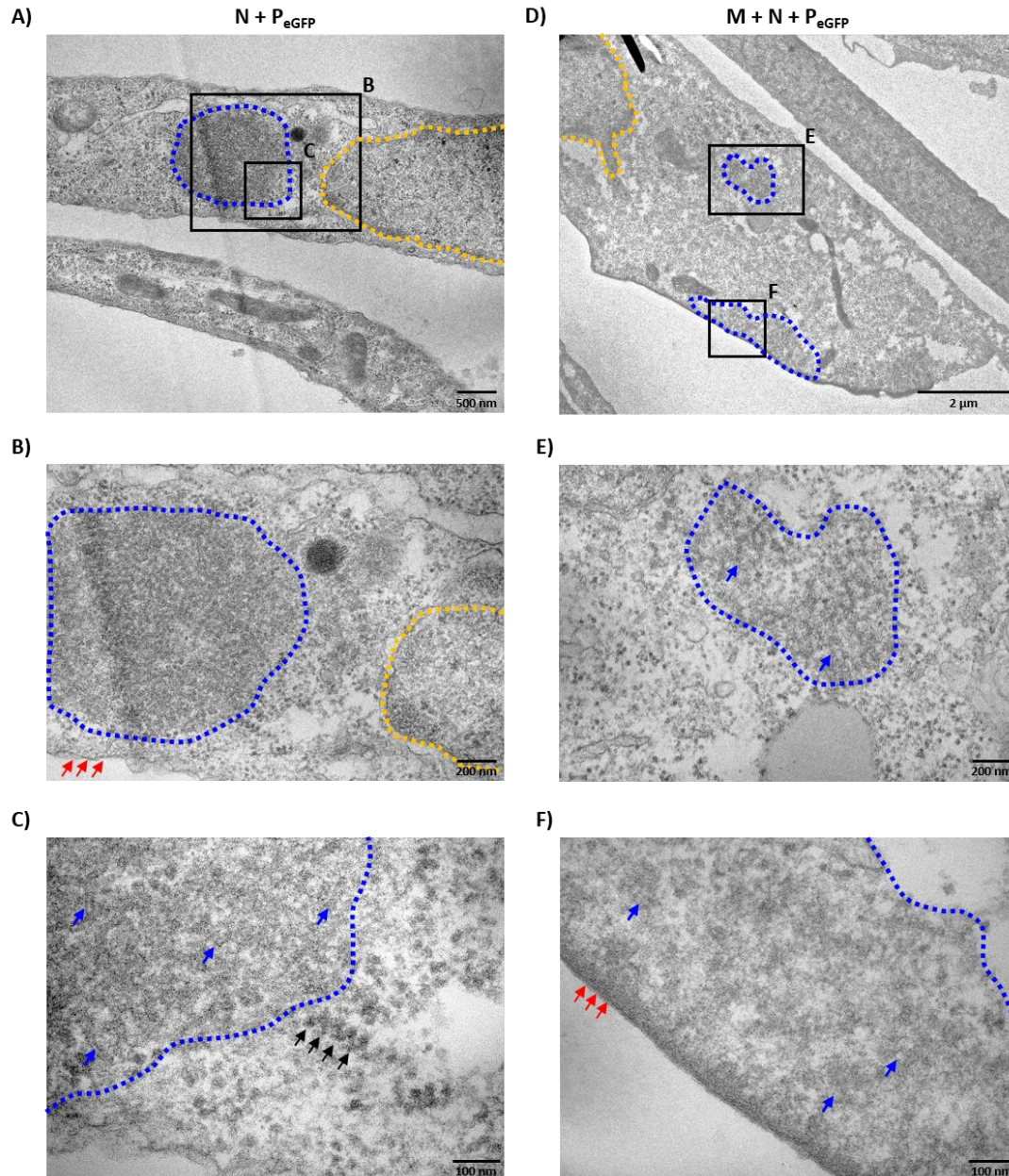


Abbildung II.6: Elektronenmikroskopische Untersuchung von NiV-N, -P und -M transient exprimierenden Zellen. Vero76-Zellen wurden auf 6-wells ausgesät und mit (A-C) pCG-MCS-NiV-N/P_{eGFP} oder mit (D-F) pCG-MCS-NiV-N/P_{eGFP} und pCG-NiV-M_{Kozak} transfiziert (FuGENE HD). 24 h p.t. wurden die Zellen fixiert und von Dr. Larissa Kolesnikova für die Transmissions-Elektronenmikroskopie vorbereitet, eingebettet, in 60 bis 90 nm dicke Scheiben geschnitten und die Schnitte an einem JEM 1400 Transmissions-Elektronenmikroskop ausgewertet. In den Abbildungen (A und D) sind die Bereichen der Vergrößerung (B-C und E-F) mit Kästchen gekennzeichnet. Die Vergrößerungen zeigen IB im Zytoplasma (B, C und E) und nahe der Plasmamembran (F). Die Pfeilspitzen zeigen zum einen auf Ribosomen/Polysome (schwarze Pfeile), auf Nukleokapsid-ähnliche Strukturen (blaue Pfeile) oder zum anderen auf die Plasmamembran (rote Pfeile). Die Umrandungen markieren zum einen intrazellulärer IB (blau) zum anderen den Zellkern (orange).

4.3 Spezifität der M-abhängigen Akkumulation der IB an der Plasmamembran

Wie für das NiV-M, ist auch für Matrixproteine anderer Paramyxoviren bekannt, dass sie mit den RNP-Komplexen interagieren und so den Transport der IB zur Plasmamembran einleiten (Iwasaki *et al.*, 2009). Allerdings ist die M-RNP-Interaktion relativ unverstanden, da die direkten Protein-Proteinbindungsdomänen nicht charakterisiert sind. Auch ist unklar, wie spezifisch diese Bindungen sind oder ob auch hier Interaktionen zwischen M-Proteinen und RNPs von nah oder fern verwandeten Viren möglich sind. Um die Frage zu klären, ob die Akkumulation der NiV-IB an der Plasmamembran auch in der Anwesenheit anderer viraler Matrixproteine auftritt oder ausschließlich in der Anwesenheit des NiV-Ms, wurden Kollokalisationsstudien mit anderen viralen Matrixproteinen durchgeführt. Vorarbeiten hierzu sind bereits in der Bachelorarbeit von Kevin Wittwer beschrieben (Wittwer, 2016). In dieser Arbeit wurden auf DG ausgesäte Vero76-Zellen (vgl. Kapitel IV.2.2) mit dem jeweiligen M-Expressionsplasmid einzeln oder mit pCG-MCS-NiV-N und pCG-MCS-NiV-P_{eGFP} kotransfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). Nach 24 h wurde die Verteilung der IB und des jeweiligen M-Proteins in PFA fixierten und TX-100 permeabilisierten Zellen untersucht. Zum Nachweis der M-Proteine (vgl. Kapitel IV.4.1.4) wurden die Zellen mit einem M-spezifischen Primärantikörper und einem AF 568-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Die IB wurden über die Autofluoreszenz des eGFP-tags am NiV-P_{eGFP} visualisiert. Zuerst wurde untersucht, ob das nah verwandte Matrixprotein des Hendravirus (HeV-M), ein weiterer Vertreter des Genus *Henipavirus*, mit den NiV-IB koloalisiert und ob diese an der Plasmamembran akkumulieren. Wie in der Einzelexpression in Abbildung II.7 A zusehen ist, akkumuliert HeV-M stark im Kern, ist jedoch auch im Zytoplasma und der Plasmamembran lokalisiert und somit NiV-M-ähnlich. In der Koexpression mit den NiV-IB koloalisiert das HeV-M mit den NiV-IB an der Plasmamembran (Abb. II.7 A, rechte Aufnahmen). Somit scheint das HeV-M in der Lage zu sein, mit den NiV-IB zu interagieren und eine Plasmamembran-nahe Lokalisation zu vermitteln. Als nächstes sollte ein weiteres Matrixprotein von einem Virus aus einem anderen Genus, aber aus derselben Familie (*Paramyxoviridae*) analysiert werden. Dazu wurde das Matrixprotein des Masernvirus (MV; *Morbilivirus*) in der Einzelexpression und Koexpression mit den NiV-IB untersucht. Das MV-M ist in der Einzelexpression hauptsächlich zytoplasmatisch verteilt und akkumuliert nur zu einem geringen Teil an

der Plasmamembran (Abb. II.7 B, linkes Bild), während es in der Koexpression zwar mit den NiV-IB perinukleär kolokalisiert, es sich aber keine IB an der Plasmamembran befinden (Abb. II.7 B, rechten Aufnahmen). Neben den beiden, nah und entfernt verwandten, paramyxoviralen M-Proteinen wurden auch weitere M-Proteine von Viren aus anderen Virusfamilien analysiert. Hierzu wurden die M-Proteine des Tollwutvirus (RABV; *Rhabdoviridae*), des Ebolavirus (EBOV; *Filoviridae*) und des Lassavirus (LASV; *Arenaviridae*) mit den NiV-IB koexprimiert. Während das RABV-M in der Einzelexpression hauptsächlich im Zytoplasma und an der Plasmamembran lokalisiert ist, kolokalisiert es in der Koexpression mit den NiV-IB und akkumuliert zu einem großen Teil in den perinukleären NiV-IB (Abb. II.7 C). Das EBOV-VP40 kolokalisiert nur zu einem sehr geringen Teil mit den NiV-IB in der Koexpression und akkumuliert hauptsächlich in Clustern an der Plasmamembran, wie auch in der Einzelexpression zu beobachten ist (Abb. II.7 D). Im Gegensatz zu RABV-M und EBOV-VP40 kolokalisiert das LASV-Z überhaupt nicht mit den NiV-IB und ist sowohl in der Einzelexpression, als auch in der Koexpression hauptsächlich zytoplasmatisch verteilt und nur geringen Teilen an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. II.7 E). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass außer dem sehr nah verwandten HeV-M kein anderes virales Matrixprotein in der Lage ist, eine Bildung der Plasmamembran-naher NiV-IB zu unterstützen, obwohl einige dieser Matrixproteine mit den perinukleären IB kolokalisierten. Dies weist darauf hin, dass die Kolokalisation vom Matrixprotein mit den perinukleären und peripheren NiV-IB von unterschiedlichen Voraussetzungen abhängen und nur letztere spezifisch für die henipaviralen M-Proteine ist.

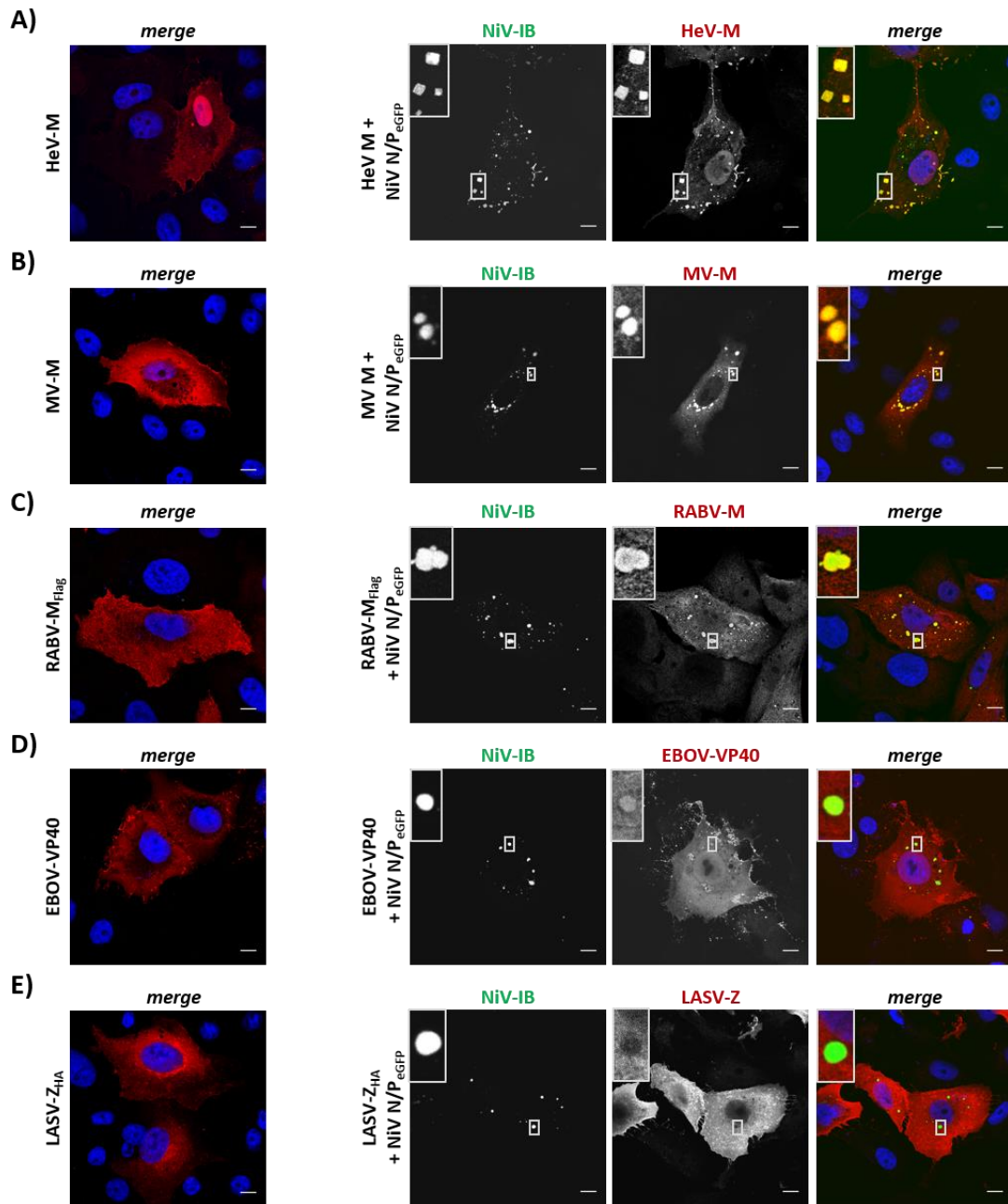


Abbildung II.7: Kolokalisation von NiV-IB und anderen viralen Matrixproteinen. (A) pCAGGS-HeV-M, (B) pSC-MV-M, (C) pCG-Rabies-M_{Flag}, (D) pCAGGS-EBOV-VP40 und (E) pCAGGS-Lassa-Z_{HA} in der Einzelexpression (linke Aufnahmen) oder in der Koexpression (rechte Aufnahmen) mit pCG-MCS-NiV-N/P_{eGFP}. Transfizierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t mit 4 % PFA fixiert und Triton X-100 permeabilisiert. Zum Nachweis der viralen Matrixproteine wurden die Zellen mit dem entsprechenden M-spezifischen Primärantikörper und einem AF 568-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Die NiV-IB wurden in der Koexpression über die Autofluoreszenz des NiV-P_{eGFP} detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und die Proben am konfokalen Laserscanning Mikroskop (Argon-Laser, DPSS 561 und 405 Diode; Leica TCS SP5 II) mit einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV-Objektiv ausgewertet. Maßstabsbalken: 10 µm.

4.4 Der nukleäre Transit des M-Proteins ist essentiell für die Lokalisierung der IB

Wie in Kapitel II.1 gezeigt, ist der nukleäre Transit des NiV-Ms (Import, Ubiquitinylierung und Export) essentiell für einen erfolgreichen Transport an die Plasmamembran. Um zu klären, welche Rolle der nukleäre Transit für die Kolokalisation mit den IB und die Lokalisation der IB an der Plasmamembran spielt, sollte untersucht werden, ob Kernimport- und Kernexport-Mutanten noch in der Lage sind mit den IB zu interagieren und die IB-Bildung an der Plasmamembran zu unterstützen. Hierzu wurden zusätzlich zu den bereits in Abbildung II.1 vorgestellten Mutante NiV-M_{K258A} zwei weitere Kernimport-Mutanten erzeugt (vgl. Kapitel IV.1.6). Zunächst NiV-M_{NLSb1/2K}, eine Mutante mit einem zerstörten NLS, aber einem intakten Lysin (K) 258. Hier wäre eine Ubiquitinylierung des K258 im Kern potentiell möglich. Diese Mutante war in der Einzeldexpression ausschließlich zytoplasmatisch verteilt (Abb. II.8 A und B). Außerdem wurde die Mutante NiV-_{S15}M_{K258A} erzeugt, in der wie in der M_{K258A}-Mutante das NLS zerstört ist. Aber während M_{K258A} nicht mehr in der Lage ist mit zellulären Membranen zu assoziieren, sollte _{S15}M_{K258A} aufgrund eines zusätzlichen N-terminalen Membran-*targeting*-Signals (S15-Peptid aus cSrc, Shenoy-Scaria *et al.*, 1993; Rodgers *et al.*, 2002) an Membranen binden (Wang *et al.*, 2010). Der in Abbildung II.8 B dargestellte Unterschied in der Einzeldexpression bestätigt die Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von M_{K258A} und _{S15}M_{K258A}. Beide sind nicht im Kern zu finden. Lediglich _{S15}M_{K258A} zeigt eine Akkumulation in kleinen Clustern an der Plasmamembran.

Neben den Kernimport-Mutanten wurde die Kernexport-Mutante NiV-M_{K258R} erzeugt, die noch ein intaktes NLS besitzt, da hier das Lysin (K) 258 gegen ein Arginin (R) ausgetauscht wurde (Abb. II.8 A). Diese Mutante wird aber nicht mehr ubiquitinyliert und kann somit nicht mehr aus dem Kern exportiert werden (Wang *et al.*, 2010). Die Einzeldexpression dieser Mutante zeigte die erwartete Akkumulation im Kern (Abb. II.8 B).

Um zu testen, ob der nukleäre Transit des M-Proteins notwendig ist für die Lokalisierung der IB an die Plasmamembran, wurden die IB in Vero76-Zellen in Anwesenheit der Kernimport- und Kernexport-Mutanten exprimiert (Abb. II.8 C). 24 h p.t. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und zum Nachweis vom M und den IB mit einem M-spezifischen Peptidserum (IG1321) und einem NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (GP3) inkubiert (vgl. Kapitel IV.4.1.1). Wie in Abbildung II.8 C

zusehen ist, kolokalisiert der M-Wildtyp wie zuvor mit den IB an der Plasmamembran. Das zytoplasmatische $M_{NLSb1/2K}$ kolokalisiert zwar auch mit den IB, diese akkumulieren aber perinukleär. Im Gegensatz dazu kolokalisiert das zytosolische M_{K258A} gar nicht mehr mit den IB, die wieder ausschließlich perinukleär vorliegen. Es ist anzunehmen, dass dies an der defekten Membranassoziation des M_{K258A} liegt, denn das Membran-gebundene $_{S15}M_{K258A}$ zeigt zumindest eine partielle Kolokalisation mit den IB. Es unterstützt allerdings keine IB-Bildung an der Plasmamembran, was darauf hinweist, dass die Akkumulation der IB an der Plasmamembran nicht alleine von der Interaktion mit einem Plasmamembran-gebundenen M ausgelöst werden kann, sondern nur von einem M, dass einen korrekten nukleären Transit mit anschließendem Plasmamembran-Transport durchlaufen hat. Die Kolokalisation von $M_{NLSb1/2K}$ und $_{S15}M_{K258A}$ mit den IB deutet darauf hin, dass das M auch ohne nukleären Transit mit den perinukleären IB interagieren kann. Diese Annahme konnte durch die Untersuchung der Kernexport-Mutante M_{K258R} weiter verdeutlicht werden. M_{K258R} akkumuliert in der Einzeldexpression fast vollständig im Kern (Abb. II.8 B), kolokalisiert aber in der Koexpression deutlich mit den perinukleären IB (Abb. II.8 C, unterste Reihe). Das zeigt, dass bei Vorhandensein perinukleärer IB ein Teil des M_{K258R} mit diesen interagiert, bevor es in den Kern importiert wird und dort akkumulieren kann. Um dieses Modell zu bestätigen, wurde eine weitere Kernexport-Mutante untersucht, und zwar die bereits in Abbildung II.1 beschriebende $NiV-M_{NESmut}$. In der Einzeldexpression akkumuliert M_{NESmut} ebenfalls ausschließlich im Kern (Abb. II.8 B). Wie M_{K258R} kolokalisiert M_{NESmut} in der Koexpression deutlich mit den IB und zeigt deshalb eine insgesamt reduzierte Kernakkumulation (Abb. II.8 C), was bestätigt, dass in der Anwesenheit der zytoplasmatischen IB neu synthetisiertes M in die IB rekrutiert wird, bevor es in den Kern importiert werden kann.

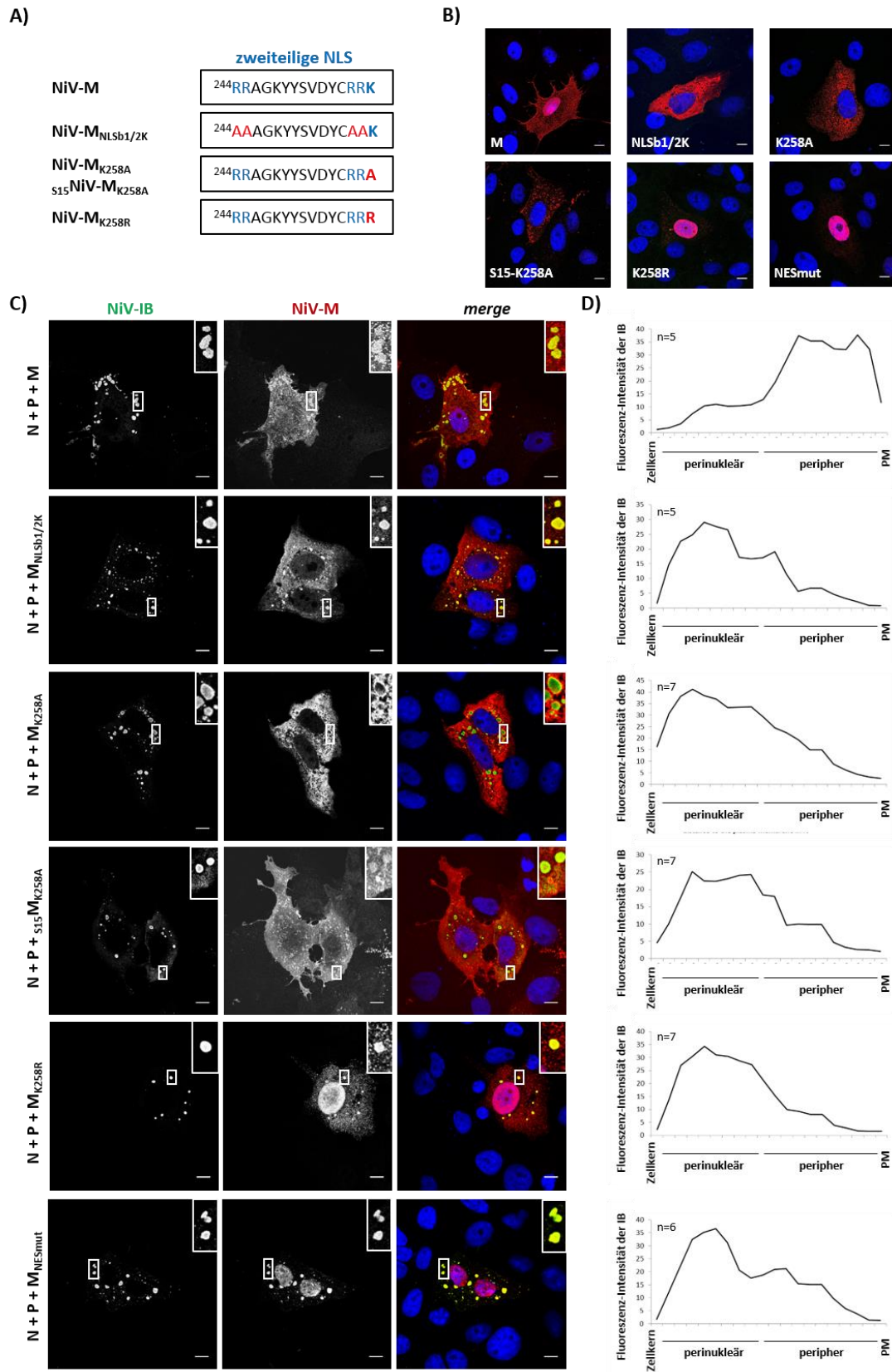


Abbildung II.8: Kolokalisation von IB mit NiV-M Kernimport- und Kernexport-Mutanten. (A) Sequenzen der M-Mutanten und (B) die Einzeldisplay dieser Mutanten in Vero76-Zellen. Dafür wurden die Zellen 24 h p.t. mit 4 % PFA fixiert und mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Zum Nachweis des NiV-M wurden die Zellen mit IG1321 und einem AF 568-markierten anti-Kaninchen-IgG-

Sekundärantikörper inkubiert. (C) Für die Kolokalisationsstudien wurden Vero76-Zellen auf DG ausgesät und mit pCG-NiV-M, pCG-NiV-M_{NLSb1/2K}, pCG-NiV-M_{K258A}, pCG-S15-NiV-M_{K258A} oder pCG-NiV-M_{K258R}, pCG-NiV-M_{NESmut} und pCG-MCS-NiV-N/-P transfiziert (LFA 2000). 24 h p.t. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das NiV-M wie oben beschrieben visualisiert. Die NiV-IB wurden mit Hilfe eines NiV-spezifischen Meerschweinchen Serum (GP3) und eines AF 488-markierten anti-Meerschweinchen-IgG-Sekundärantikörpers detektiert (Argon-Laser; Leica TCS SP5 II). (D) Quantifizierung der Lokalisation der IB mit Hilfe von NukLoM in 5-7 Zellen (siehe IV.4.1.6). IB: *inclusion bodies*; PM: Plasmamembran. Maßstabsbalken: 10 µM.

4.5 Charakterisierung des rNiV-M_{NESmut}

Unklar ist, inwieweit die Interaktion eines Transport-defekten NiV-Ms mit den IB eine produktive NiV-Infektion beeinflussen kann. Bisher wurde lediglich ein rekombinantes Virus untersucht, in dem das M-Gen vollständig deletiert war (NiVΔM). In diesem Fall war das Virus-Assembly gestört und es wurden große Menge nicht-infektiöser Partikel freigesetzt (Dietzel *et al.*, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun mit Hilfe eines rekombinanten NiV geklärt werden, welchen Einfluss ein NiV-M, welches noch mit den IB interagieren kann, ansonsten aber Transport-defekt ist, auf die Replikation, Bildung und Freisetzung infektiöser Partikel hat. Zu diesem Zweck haben Anja Heiner, Laura Behner und Dr. Michael Weis aus unserer Arbeitsgruppe mit unserem etablierten *reverse genetics system* ein rekombinantes rNiV-M_{NESmut} erzeugt, in dem das Gen für das wildtypische M durch das für die Kernexport-Mutante M_{NESmut} ersetzt ist (vgl. Kapitel IV.3.1). Zunächst wurden Vero76-Zellen mit rNiV-M_{NESmut} infiziert, um Kolokalisationsstudien durchzuführen. In Abbildung II. 9 A ist zu sehen, dass sich 24 h p.i. bereits deutliche Synzytien gebildet haben. Wie in der transienten Koexpression ist M_{NESmut} auch in den rNiV-M_{NESmut}-infizierten Zellen nicht nur im Kern lokalisiert, sondern kolokalisiert deutlich mit den perinukleären IB (Abb. II.9 A). Dies bestätigt, dass das mutierte M-Protein auch im viralen Kontext mit den perinukleären IB interagieren kann, bevor dies in den Kern gelangt. Ebenso wie in der Kotransfektion, ist die Kernexport-Mutante nicht in der Lage eine IB-Akkumulation in der Nähe der Plasmamembran zu unterstützen. Dies bestätigt die Annahmen, dass nur ein NiV-M, welches einen korrekten nukleären Transit durchlaufen hat, die Akkumulation der IB an der Plasmamembran ermöglicht.

Als nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss ein mutiertes NiV-M, welches zwar noch mit den perinukleären IB kolokalisiert, aber die IB-Bildung an der Plasmamembran nicht unterstützt, auf das Virus-Assembly und die Replikation hat. Hierbei muss erwähnt

werden, dass alle an dieser Stelle beschriebenen infektiösen Arbeiten unter BSL-4-Bedingungen von Laura Behner und Anja Heiner durchgeführt wurden. Dabei konnten für das rNiV-M_{NESmut} signifikant größere Synzytien im Vergleich zum rNiVwt beobachtet werden (Abb. II.9 B). Das lässt vermuten, dass bei fehlender Akkumulation des M_{NESmut} an der Plasmamembran, die Glykoprotein-vermittelte Zell-Zell-Fusion effizienter verläuft. Die in Abbildung II. 9 C dargestellten Wachstumskurven belegen, dass trotz der schnelleren Virusausbreitung über Zell-Zell-Fusion, rNiV-M_{NESmut} im Vergleich zum Wildtyp-Virus eine deutlich verzögerte Wachstumskinetik aufweist und bis zu 100-fach weniger infektiöse Partikel freigesetzt werden. Um zu untersuchen, ob der geringere Titer auf eine insgesamt verminderte Partikelfreisetzung, oder auf die vermehrte Freisetzung nicht-infektiöser Partikel zurückzuführen ist, wurde die virale RNA im Überstand von rNiVwt- und rNiV-M_{NESmut}-infizierten Zellen mittels qPCR quantifiziert (vgl. Kapitel IV.1.12). Die Quantifizierung der viralen N-mRNA dient hierbei als indirekter Nachweis für die Anzahl der Viruspartikel. Das Ergebnis in Abbildung II. 9 D zeigt, dass zu frühen Zeitpunkten der Infektion (24 h p.i.) eine erhöhte RNA-Menge im Überstand von rNiV-M_{NESmut}-infizierten Zellen detektiert werden konnte. Zu späteren Zeitpunkten (48 h und 72 h p.i.) gleichen sich die RNA-Mengen in beiden Virusinfektionen an. Zur Bestimmung der relativen Partikel-Infektiosität wurde der Virustiter nach 24 h p.i. (TCID₅₀/ml) durch die relative Anzahl der Viruspartikel zum gleichen Zeitpunkt (2^{-Ct}) geteilt. Setzt man diesen Quotient für das rNiVwt auf 1, erhält man für das rNiV-M_{NESmut} eine relative Partikel-Infektiosität von 0,035, d.h. eine Reduktion um das 28-fache (Abb. II.9 E). Zusammengefasst zeigen die Infektionsstudien, dass die Expression eines Kerntransport-defizienten NiV-M im Kontext einer produktiven Virusinfektion in einem beträchtlichen Assembly-Defekt und einer deutlich reduzierte Partikel-Infektiosität resultiert. Ähnliches wurde auch für das M-depletierte rNiVΔM beobachtet (Dietzel *et al.*, 2015). Somit ist kein signifikanter Unterschied zwischen der fehlenden M-Expression und der Expression eines funktionell defekten M-Proteins (rNiV-M_{NESmut}) festzustellen.

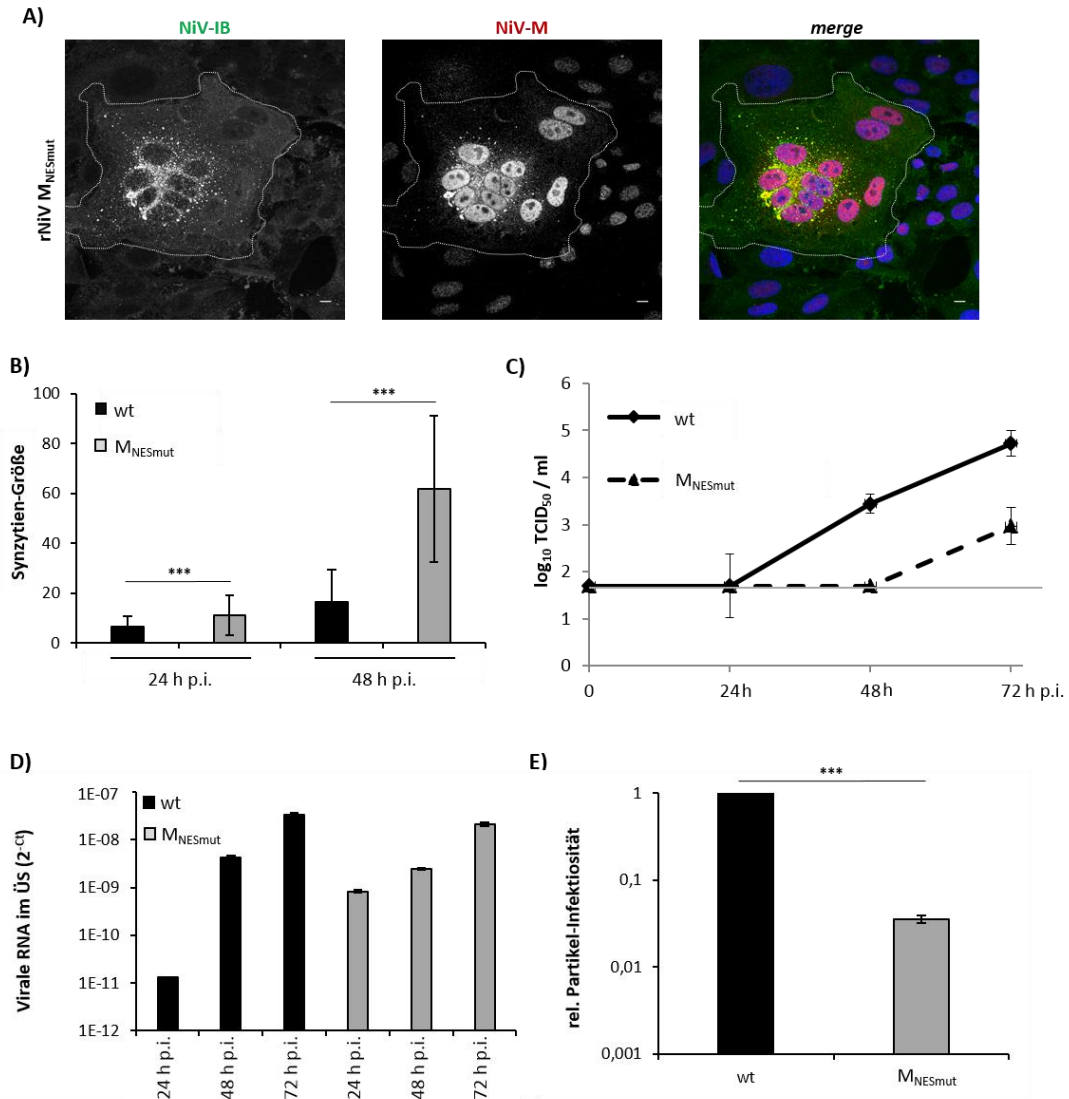


Abbildung II.9: Charakterisierung einer rekombinanten NiV-Mutante (rNiV-MNESmut). (A) Vero76-Zellen wurden mit rNiV-MNESmut und einer MOI von 0,005 infiziert. 24 h p.i. wurden die Zellen mit 4 % PFA für 48 h fixiert und anschließend mit Triton X-100 permeabilisiert. Zum Nachweise des NiV-Ms wurden die Zellen mit einem Peptid-spezifischen Antikörper (IG1321) und einem AF 568-markierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper inkubiert. Die NiV-IB wurden mit Hilfe eines NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (GP3) und eines AF 488-markierten anti-Meerschweinchen-IgG-Sekundärantikörpers detektiert (Leica TCS SP5 II). Gezeigt sind Maximalprojektionen von Stapelaufnahmen der infizierten Zellen (20 z-Schnitte). Maßstabsbalken: 10 μ M. (B) Für die Quantifizierung der Synzytien-Größe wurden Vero76-Zellen mit rNiVwt und rNiV-MNESmut und einer MOI von 0,005 infiziert. 24 h und 48 h p.i. wurden die Zellen mit 4 % PFA für 48 h fixiert. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Synzytien-Größe wurden die Zellkerne pro Synzytium ausgezählt und von mindestens 15 Synzytien gemittelt. (C) Zur Untersuchung der Wachstumskinetik wurden die Virustiter mittels TCID₅₀ nach 0, 24, 48 und 72 h p.i. ermittelt. Die graue Linie stellt das Detektionslimit der TCID₅₀ dar. (D) Zur Bestimmung der relativen Viruspartikelmenge wurde die RNA von 100 μ l Überstand infizierter Zellen nach 24, 48 und 72 h p.i. isoliert. Die RNA wurde mittels qPCR und NiV-N-spezifischen Primern quantifiziert. (E) Um die relative Partikel-Infektiösität zu ermitteln wurde der Quotient aus dem Virustiter (24 h p.i., TCID₅₀/ml) und der relative RNA-Menge im Zellüberstand (2^{-Ct}) berechnet. Die Ergebnisse wurden auf rNiVwt normalisiert, indem dessen relative Partikel-Infektiösität auf 1 gesetzt wurde. ***, $P \leq 0.001$

4.6 Unterschiede in der Oligomerisierung der M-Mutanten

Wie in Kapitel II.5.2 gezeigt, ist NiV-M_{K258A} überhaupt nicht in der Lage mit den IB zu interagieren und diese an die Plasmamembran zu lokalisieren. Die Plasmamembran-assoziierte NiV-S15M_{K258A} Mutante konnte zu Teilen mit perinukleären IB kolokalisieren. Es ist aber unklar, welche Voraussetzungen für eine funktionelle IB-Interaktion beim NiV-M_{K258A} fehlen. Um zu klären, ob eventuell ein Defekt in der Oligomerisierung für die fehlende Interaktion zwischen M_{K258A} und den perinukleären IB verantwortlich ist, wurde die Oligomerisierung der M-Mutanten untersucht. Hierfür wurden Vero76-Zellen auf 6-wells ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für das M bzw. die M-Mutanten kodieren (vgl. Kapitel IV.2.3). 24 h p.t. wurden die Zellen mit einem Triton-Lysis-Puffer, wie in Kapitel IV.4.5 beschrieben, lysiert. Die Zelllysate wurden aufgeteilt und mit SDS-Gel-Probepuffer (PP) mit bzw. ohne β -Mercaptoethanol (β -ME) gemischt. Die Proben wurden dann unter reduzierenden (+ β -ME) oder unter nicht-reduzierenden (- β -ME) Bedingungen über ein 10 % SDS-Gel aufgetrennt (vgl. Kapitel IV.4.6). Nachdem die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet wurden, wurden die M-Proteine im Western Blot durch das M-spezifische Peptidserum (IG1321), einen biotinylierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper und Streptavidin-HRP mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Substrats nachgewiesen (vgl. Kapitel IV.4.6). Wie in Abbildung II.10 A (+ ME) zu sehen ist, liegen alle M-Proteine unter reduzierenden Bedingungen als Monomere von ca. 40 kDa vor. Die untere Bande resultiert aus einem zweiten Start-Codon (ATG an Nukleotidposition 37-39), denn wie bereits früher gezeigt werden konnte, entsteht bei einer transienten M-Expression neben dem Volle-Länge-Protein ein N-terminal um 13 AS verkürztes Protein (Diplomarbeit Boris Lamp, 2008). Betrachtet man die oligomeren Formen von M_{K258A} und S15M_{K258A} unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. II.10 B), so sieht man, dass hier genau wie beim Wildtyp-M vor allem Monomere und zu geringem Maß auch Dimere und Tetramere detektiert werden können. Das bedeutet, dass Unterschiede in der Oligomerisierung wahrscheinlich nicht für die fehlende Interaktion von NiV-M_{K258A} mit den IB verantwortlich sind.

Im Weiteren wurden auch die anderen in dieser Arbeit erzeugten M-Mutanten auf ihre Oligomerisierung hin untersucht. Das Ergebnis ist im rechten Teil der Abbildung II.10 C und D gezeigt. Auch M_{NLSb1/2K}, M_{NESmut} und M_{K258R} liegen unter nicht reduzierenden

Bedingungen als Monomere, Dimere, Tetramere und sogar als noch höhere Oligomere vor. Im Vergleich zum Wildtyp-M findet man bei all diesen Kernimport- und Kernexport-Mutanten viel mehr Dimere, was für einen Unterschied in der Oligomerisierung sprechen könnte.

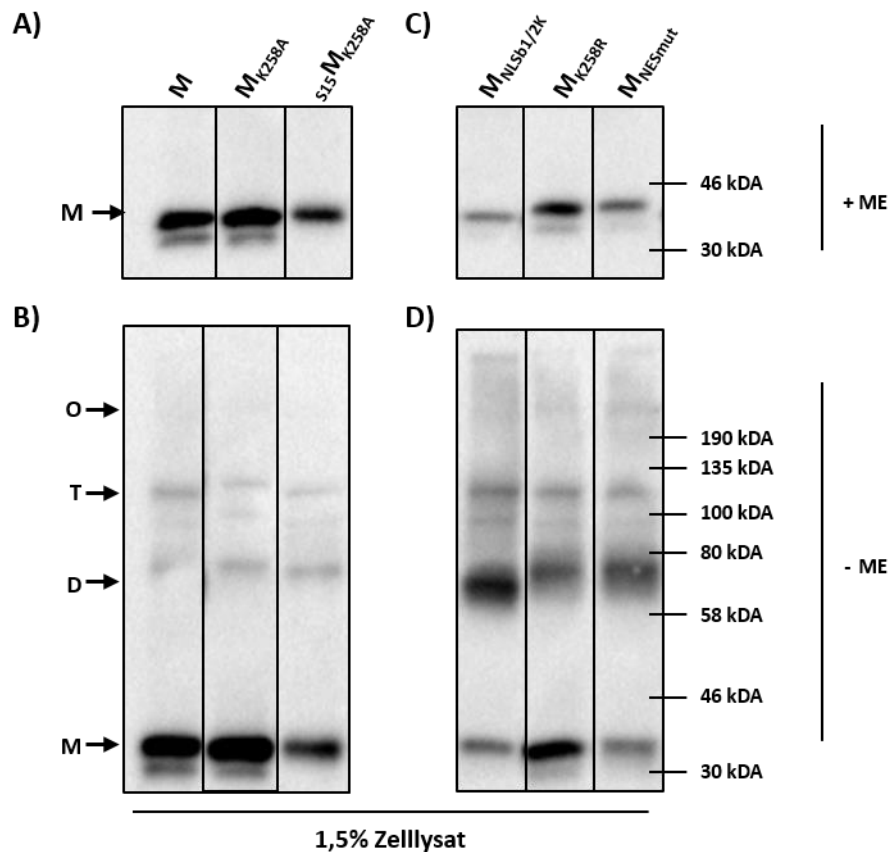


Abbildung II.10: Oligomerisierung der M-Mutanten. M-exprimierende Vero76-Zellen wurden auf 6-wells ausgesät. 24 h p.t. wurden die Zellen in Triton-Lysis-Puffer lysiert. 1,5 % des Zelllysates wurden unter reduzierenden (A und C, + β -ME) oder unter nicht-reduzierenden Bedingungen (B und D, - β -ME) in einem 10 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose geblottet. Zum Nachweis der NiV-M-Proteine wurden die Membran mit einem Peptid-spezifischen Antikörper (IG1321), einem biotinylierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper und Streptavidin-HRP (*horseshoe peroxidase*) inkubiert. Die gebundene Peroxidase wurde durch ein Luminol-Substrat (Super Signal West Dura Extended Duration Substrat) nachgewiesen. Die Auswertung der Chemilumineszenz-Signale erfolgte direkt im Anschluss am Chemidoc XRS+ (Biorad). M=Monomere, D=Dimere, T=Tetramere und höhere Oligomere.

5. Einfluss des Zytoskeletts auf die Lokalisation der IB

5.1 Intakte und dynamische Aktinfilamente sind essentiell für den Oberflächentransport des M-Proteins

In Hinblick darauf, dass die gezielte Hemmung von zellulären Transportwegen ein wichtiger Ansatzpunkt für antivirale Strategien ist, sollte zunächst geklärt werden, ob das Zytoskelett beim M-Transport und damit in virale Assembly-Prozesse involviert ist. Dazu wurde die M-Verteilung in Anwesenheit von Mikrotubuli (MT)- bzw. Aktin-Inhibitoren analysiert. Als MT-Inhibitor wurde Nocodazol (Noco) verwendet, welches an Tubulin bindet und durch die ständig ablaufenden Depolymerisationsvorgänge zur Auflösung der Mikrotubuli führt. Der Aktin-Inhibitor Cytochalasin D (CytoD) verhindert die Bindung von freiem G-Aktin an F-Aktin, sodass die Aktinfilamente der Zelle depolymerisieren und damit das Aktinzytoskelett zerstört wird. Für die Inhibitorstudien wurden Vero76-Zellen auf DG ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit pCG-NiV-M_{Kozak} transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). 2 h p.t. wurden die Zellen mit den Inhibitoren Nocodazol (0,5 μ M) bzw. Cytochalasin D (1 μ M) behandelt (vgl. Kapitel IV.4.1.5). 10 h p.t. wurden die Zellen mit PFA fixiert und Triton permeabilisiert. Der M-Nachweis erfolgte über das M-spezifische Peptidserum aus dem Kaninchen (IG1321) und einen AF 568-markierten Sekundärantikörper. Die Mikrotubuli wurden mit einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper aus der Maus und einem AF 488-markierte Sekundärantikörper und das F-Aktin durch Phalloidin-Atto488 visualisiert. Wie in Abbildung II.11 A zusehen ist, akkumuliert das M deutlich an der Plasmamembran ohne eindeutige Kolokalisation mit den Mikrotubuli. Ebenso beeinflusst die Zugabe von Noco die M-Verteilung nicht (Abb. II.11 A; 0,5 μ M Noco). Bei der Koimmunfluoreszenzanalyse vom M mit Aktin ist in der Kontrolle eine deutliche Kolokalisation des M-Proteins mit den Aktinfilamenten am Zytokortex zu beobachten (Abb. II.11 B, w/o CytoD). Zerstört man das Aktinzytoskelett mittels CytoD, sieht man keine Akkumulation und Kolokalisation vom M mit Aktinfilamenten am Zytokortex mehr. Dies weist eindeutig darauf hin, dass ein intaktes und dynamisches Aktinzytoskelett essentiell für den M-Transport an die Plasmamembran ist.

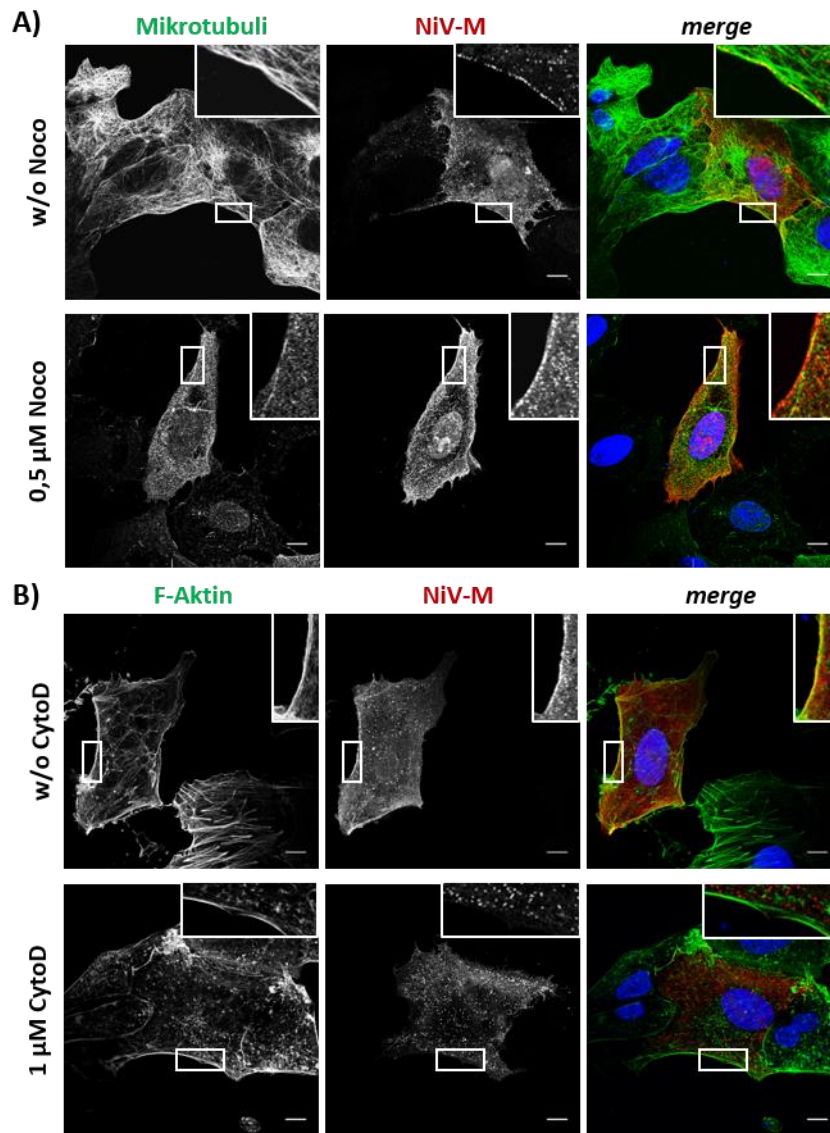


Abbildung II.11: Kolokalisation von M mit Tubulin bzw. Aktin in An- und Abwesenheit von Nocodazool bzw. Cytochalasin D. pCG-NiV-M_{Kozak} transfizierte Vero76-Zellen wurden 2 h p.t. für 8 h ohne (w/o Nocodazol) und mit 0,5 µM Nocodazol (A) oder ohne (w/o CytoD) und mit 1 µM CytochalasinD (B) inkubiert. 10 h p.t. wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und Triton X-100 permeabilisiert. Das NiV-M wurde durch einen Peptid-spezifischen Antikörper (IG1321) und einen AF 568-markierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Mikrotubuli (A) wurden durch einen α -Tubulin-spezifischen Antikörper und einen AF 488-markierten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper visualisiert. F-Aktin (B) wurde durch Phalloidin-Atto488 detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Proben wurden am konfokalen Laserscanning Mikroskop (Argon-Laser, DPSS 561 und 405 Diode; Leica TCS SP5 II) mit einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV-Objektiv ausgewertet. Maßstabsbalken: 10 µM.

5.2 Die Bildung peripherer IB benötigt ein intaktes Aktinzytoskelett

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Transport des M-Proteins an die Plasmamembran Aktin-abhängig ist, sollte der Einfluss des Zytoskeletts auf die Bildung und die Lokalisation der IB untersucht werden. Dazu wurden Vero76-Zellen auf DG ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit pCG-MCS-NiV-N und pCG-MCS-NiV-P_{eGFP} alleine oder in Kombination mit pCG-NiV-M_{Kozak} transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). 2 h p.t. wurden die Zellen mit Noco (0,5 µM) bzw. CytoD (1 µM) behandelt (vgl. Kapitel IV.4.1.5). 10 h p.t. wurden die Zellen mit PFA fixiert und Triton permeabilisiert. Das M wurde mit dem M-spezifischem Peptidserum (IG1321) und einem FarRed-(AF 647) markierten anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörper nachgewiesen, während die IB über die Autofluoreszenz des P_{eGFP} detektiert werden konnten. Die Mikrotubuli wurden mit einem α-Tubulin-spezifischen Primärantikörper und einem AF 568-markierten Sekundärantikörper und das F-Aktin mit Phalloidin-TRITC visualisiert. In Abwesenheit vom M akkumulierten die IB wie erwartet ausschließlich perinukleär. Weder Nocodazol, noch Cytochalasin D haben einen Einfluss auf die Lokalisierung oder die Größe der IB (Abb. II.12 A, B). Dies weist daraufhin, dass das Zytoskelett bei der Bildung der perinukleären IB keine Rolle spielt. Wie in Abbildung II.12 C zu sehen ist, hat Noco auch in der Koexpression von M und den IB keine Auswirkung auf die Kolokalisation oder Lokalisierung der IB an der Plasmamembran. Allerdings kommt es in den CytoD-behandelten Zellen nicht mehr zu einer Bildung von IB an der Plasmamembran, auch wenn das M noch mit den IB kolokalisiert (Abb. II.12 D). Die Quantifizierung der Verteilung der IB mit Hilfe von NukLoM bestätigt eindeutig eine vornehmlich perinukleäre Lokalisation der IB in CytoD-behandelten Zellen (Abb. II.12. E, ganz unten). Somit scheint ein intaktes und dynamisches Aktinzytoskelett nicht nur für den M-Transport an sich, sondern auch für die M-abhängige Lokalisation der IB an die Plasmamembran notwendig zu sein.

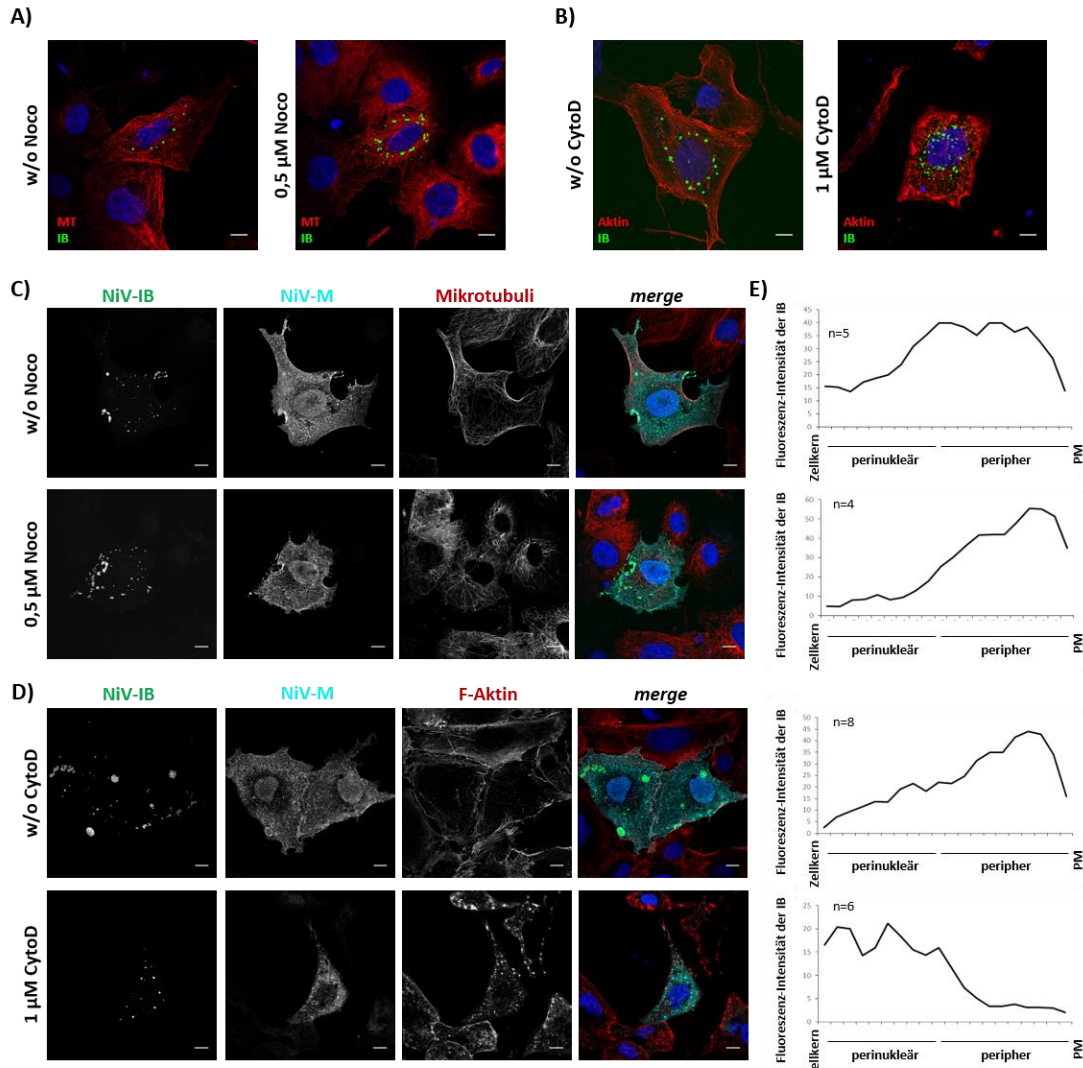


Abbildung II.12: Kolokalisation von M und IB mit Tubulin oder Aktin in An- und Abwesenheit von Nocodazolo oder Cytochalasin D. (A, B) pCG-MCS-NiV-N und pCG-MCS-NiV-P_{eGFP} transfizierte Vero76-Zellen wurden 2 h p.t. für 8 h ohne (w/o Noco) bzw. mit 0,5 µM Noco (A) oder ohne (w/o Cyto D) bzw. mit 1 µM CytoD (B) inkubiert. 10 h p.t. wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und Triton X-100 permeabilisiert. Die Mikrotubuli (A) wurden durch einen α -Tubulin-spezifischen Antikörper und einen AF 568-markierten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper und F-Aktin (B) durch Phalloidin-TRITC detektiert. Die IB wurden über die Autofluoreszenz des eGFP-tag am NiV-P_{eGFP} nachgewiesen. (C,D) pCG-MCS-NiV-N, pCG-MCS-NiV-P_{eGFP} und pCG-NiV-M_{Kozak} transfizierte Vero76-Zellen wurden 2 h p.t. für 8 h ohne (w/o Noco) und mit 0,5 µM Noco (C) oder ohne (w/o CytoD) und mit 1 µM CytoD (D) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Peptid-spezifischen Antikörper (NiV-M; IG1321) und einem AF 647-markierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper und einem α -Tubulin-spezifischen Primärantikörper und einem AF 568-markierten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper inkubiert. Das F-Aktin wurde über Phalloidin-TRITC und die IB über die Autofluoreszenz des NiV-P_{eGFP} visualisiert. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (HeNe 633; Argon-Laser, DPSS 561 und 405 Diode; Leica TCS SP5 II) mit einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV-Objektiv. (E) Quantifizierung der IB-Autofluoreszenz (P_{eGFP}) in 4-8 Zellen mit Hilfe von NukLoM (siehe IV.4.1.6). IB: inclusion bodies; PM: Plasmamembran. Maßstabsbalken: 10 µM.

6. Die C-terminale Region des Ms beeinflusst die Akkumulation der IB an die Plasmamembran

Takimoto *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die Aminosäuren (AS) am C-Terminus der Matrixproteine des Sendaivirus (SeV) und des humanen Parainfluenzavirus (hPIV1) essentiell für eine erfolgreiche Freisetzung des jeweiligen M-Proteins sind. Es sollte nun getestet werden, ob die C-terminale Region auch im NiV-M von funktioneller Bedeutung ist. Dazu wurde eine Mutante generiert, in der die letzten sechs AS durch Alanine ersetzt sind (Abb. II.13 A). Um zu überprüfen, ob diese Mutation einen Einfluss auf die Membranassoziation hat, wurde von Nico Becker, im Rahmen seiner Bachelor-Arbeit, ein Flotations-Assay mit M, M_{347-352A} und M_{K258A} durchgeführt. Die praktische Durchführung erfolgte nach einem etablierten Protokoll, das Nicole Runkler für das Masernvirus M-Protein in ihrer Doktorarbeit etabliert hat (Runkler *et al.*, 2007). Kurz zusammengefasst werden für den Flotations-Assay die in einem hypotonen Puffer aufgequollenen M-exprimierenden Zellen durch Scheren in einer Kanüle aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren der Zellkerne wurde der postnukleäre Überstand auf eine 35 %ige Iodixanol (OptiPrep)-Lösung eingestellt und mit 30 %iger OptiPrep-Lösung und TNE-Puffer überschichtet. Ist ein Matrixprotein membranassoziiert, flotiert es während der anschließenden Gleichgewichtszentrifugation in dem nicht-linearen OptiPrep-Gradienten in die Interphase (zwischen 30%ige OptiPrep-Lösung und TNE-Puffer). Es werden dann zehn Gradientenfraktionen von oben abgenommen, jeweils mit SDS-Probepuffer (+ ME) versetzt, im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Das M-Protein in den oberen (Membran-assoziierte) und unteren (löslichen) Fraktionen wird anschließend im Western Blot nachgewiesen. In Abbildung II.13 B ist das Ergebnis des Flotationsassays zu sehen (durchgeführt von Nico Becker, aber zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch nicht in Form einer Bachelor-Arbeit veröffentlicht). Hier sieht man, dass sich das Wildtyp-M und das M_{347-352A} auch in den oberen Membran-Fraktionen befinden, während das bekanntermaßen nicht-membranassoziierte M_{K258A} ausschließlich in den unteren, löslichen Fraktionen zu finden ist.

Die Membranassoziation der Mutante M_{347-352A} scheint quantitativ geringer zu sein als die des Wildtyp-Ms (anteilmäßig weniger M in den oberen Fraktionen), somit scheint die Mutation der C-terminalen Region des NiV-Ms die Membranassoziation nicht

prinzipiell zu verhindern, aber wahrscheinlich zu reduzieren. Um dem nachzugehen sollte als nächstes untersucht werden, ob diese Mutante weiterhin an die Plasmamembran gelangt. Dafür wurden Vero76-Zellen auf DG ausgesät und anschließend mit pCG-NiV-M_{Kozak} bzw. pCG-NiV-M_{347-352A} transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). 24 h p.t. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und Aktin und das M über Phalloidin-Atto488 und IG1321 visualisiert. Im Gegensatz zum Wildtyp-M ist M_{347-352A} zwar noch in der Nähe der Plasmamembran zu finden, es akkumuliert und kolokalisiert aber nicht mehr mit dem Aktinzytokortex an der Plasmamembran (Abb. II.13 C). Es stellt sich daher die Frage, inwieweit dies die M-abhängige IB-Lokalisation in der Peripherie beeinflusst. Um dies zu klären wurde M_{347-352A} zusammen mit N und P_{eGFP} in Vero 76-Zellen koexprimiert. In der IFA ist zu beobachten, dass das M_{347-352A} die Akkumulation der IB an der Plasmamembran nicht unterstützen kann, wenngleich M_{347-352A} und die IB perinukleär kolokalisieren (Abb. II.13 D). Dies weist daraufhin, dass die basischen Aminosäuren des C-Terminus eine Rolle bei der Interaktion des NiV-Ms mit dem Zytokortex spielen und, dass dies wahrscheinlich essentiell für die M-abhängige Akkumulation von IB in der Nähe der Plasmamembran ist.

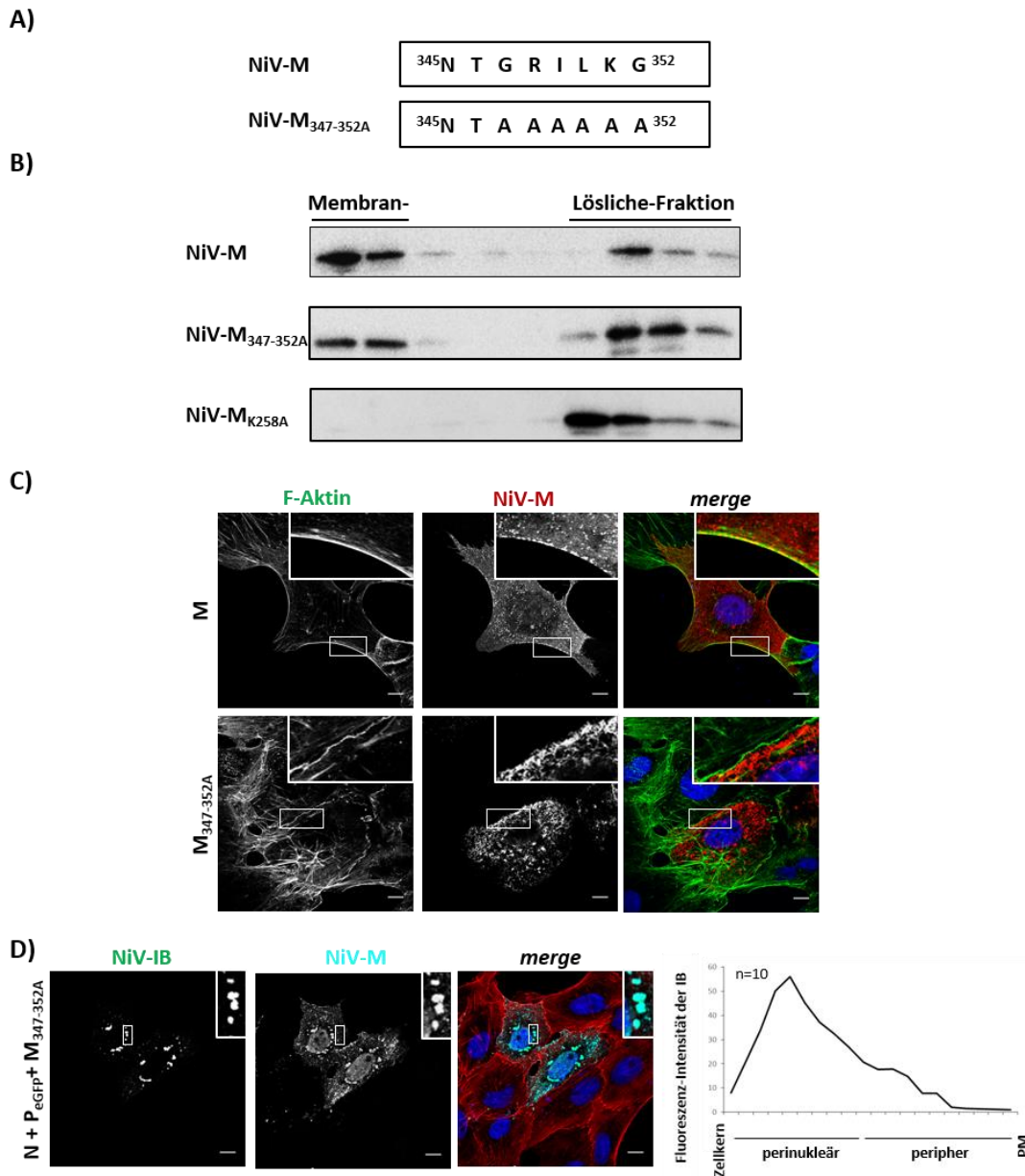


Abbildung II.13: Lokalisationsstudien eines M mit deletierten C-Terminus. (A) Sequenz der Substitutions-Mutante NiV-M_{347-352A}. (B) Flotations-Assay aus der Bachelor-Arbeit von Nico Becker. (C) pCG-NiV-M oder pCG-NiV-M_{347-352A} transfizierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. mit 4 % PFA fixiert und Triton X-100 permeabilisiert. Das NiV-M wurden durch einen Peptid-spezifischen Antikörper (IG1321) und einen AF 568-markierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper und F-Aktin durch Phalloidin-Atto488 detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Proben wurden am konfokalen Laserscanning Mikroskop (Argon-Laser, DPSS 561 und 405 Diode; Leica TCS SP5 II) mit einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV ausgewertet. (D) pCG-MCS-NiV-N, pCG-MCS-NiV-P_{eGFP} und pCG-NiV-M_{347-352A} transfizierte Vero76-Zellen wurden 24 h p.t. fixiert und permeabilisiert. Das NiV-M wurden durch den Peptid-spezifischen Antikörper (IG1321) und ein AF 647-markierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper und F-Aktin durch Phalloidin-TRITC nachgewiesen. Die IB wurden durch die Autofluoreszenz des NiV-P_{eGFP} nachgewiesen und die Proben am konfokalen Laserscanning Mikroskop (HeNe 633, Argon-Laser, DPSS 561 und 405 Diode; Leica TCS SP5 II) mit einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV-Objektiv ausgewertet. (Graphen) Quantifizierung der Fluoreszenzverteilung zum Nachweis der IB-Verteilung mit Hilfe des ImageJ-Makros NukLoM von S. Halwe (siehe IV.4.1.6). IB: inclusion bodies; PM: Plasmamembran. Maßstabsbalken: 10 µM.

III. Diskussion

1. Zelltyp-abhängige Kinetik beim Kerntransit des NiV-Ms

Für einen erfolgreichen Transport des NiV-Ms an die Plasmamembran ist es notwendig, dass neu synthetisiertes NiV-M den Zellkern passiert (Wang *et al.*, 2010; Pentecost *et al.*, 2015). Da dies bislang jedoch nur für HeLa-Zellen eindeutig beschrieben wurde, befasste sich der erste Teil dieser Arbeit mit dem Kerntransit des NiV-Ms in verschiedenen Zelltypen. In allen untersuchten Zelllinien, d.h. in Vero76-Zellen (Nierenepithelzellen aus Meerkatzen), A549-Zellen (humane alveoläre Lungenepithelzellen), PBMEC (*primary porcine brain microvascular endothelial cells*), MDCK-Zellen (Nierenepithelzellen aus dem Hund) und in Huh7-Zellen (humane Hepatomazellen) gelangte die Kernimport-Mutante (NiV-M_{NLSb1/2K}) nicht mehr an die Plasmamembran und die Kernexport-Mutante (NiV-M_{NESmut}) akkumulierte im Zellkern (vgl. Abb. II.1). Dies beweist, dass der nukleäre Transit in allen Zelltypen stattfindet und essentiell für den NiV-M Transport an die Plasmamembran ist. Im Gegensatz zu den anderen Zelltypen war in MDCK-Zellen zwar die Kernexport-Mutante deutlich im Kern nachweisbar (vgl. Abb. II.1 E), das wildtypische NiV-M zeigte in diesen Zellen in *steady-state*- oder *live cell imaging*-Analysen aber keine detektierbare Kernlokalisation, was auf eine sehr kurze Verweildauer des M-Proteins im Kern spricht, wenn die Kernexportsignale intakt sind (vgl. Abb. II.1 A-C). Letztendlich haben die Untersuchungen gezeigt, dass es keinen prinzipiellen Unterschied im nukleären Transit des NiV-Ms in den unterschiedlichen Zelllinien gibt, jedoch Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Transport-Kinetik.

Wichtig für den nukleären Transit in eukaryotische Zellen ist der *nuclear core complex* (NPC), der sowohl den Import als auch den Export von Proteinen und mRNA regulieren kann (Dworetzky *et al.*, 1988). Ein möglicher Grund für die beobachteten unterschiedlichen Kerntransit-Kinetiken (eher langsam in Vero-Zellen und schnell in MDCK-Zellen) kann die Spezies- und Zelltyp-abhängig sehr stark variierende Anzahl von NPC sein ($5 \times 10^3 - 5 \times 10^7$ pro Kern; Lim *et al.*, 2008). Wäre die Anzahl an NPC in Vero76-Zellen höher als in MDCK-Zellen und die Kapazität einer Ubiquitylierung am Lysin 258 (K258) durchzuführen gleich, dann würde dies dazu führen, dass in Vero76-Zellen mehr NiV-M importiert wird als es ubiquityliert werden kann, wodurch es im Kern

akkumuliert. In den MDCK-Zellen könnte die geringere Menge an importiertem NiV-M effizient ubiquitinyliert und exportiert werden, sodass kein NiV-M im Zellkern akkumuliert. Alternativ könnte aber auch eine effektivere Ubiquitinylierung in MDCK-Zellen bei vergleichbaren Mengen an NPC der Grund für die schnellere Kinetik des nukleären Transits des NiV-Ms in MDCK-Zellen sein (Melvin *et al.*, 2013).

Einfluss der unterschiedlichen NiV-M-Kinetiken auf die Interferonantwort

Eine wichtige Aufgabe der angeborenen Immunantwort während einer Virusinfektion ist die Wahrnehmung des eindringenden Virus und das Auslösen eines „antiviralen Status“, um der Infektion entgegenzuwirken. Dabei induzieren die meisten Viren zuerst die Produktion und die Freisetzung von Interferon- β (IFN- β). Sezerniertes IFN- β bindet dann an die Rezeptoren der umliegenden Zellen und löst dadurch eine Signalkaskade aus, welche zur Produktion von IFN-stimulierten Genen (ISGs) führt. Die Produkte dieser Gene sind antivirale Proteine, wie z.B. OAS, PKR und MxA, die die Infektion der benachbarten Zellen verhindern (Sadler und Williams, 2008). Viele Viren können dieses Interferonsystem allerdings inhibieren. Für NiV ist bekannt, dass die C-, V- und W-Proteine als Interferon-Antagonisten fungieren können (Park *et al.*, 2003; Habchi und Longhi, 2015). Dabei ist für das NiV-W beschrieben, dass es sich im Kern befinden muss, um die IFN- β -Antwort blocken zu können (Shaw *et al.*, 2005). Kürzlich konnten Bharaj *et al.* (2017) nachweisen, dass auch das NiV-M die IFN- β -Antwort inhibieren kann. Um die Signalkaskade der IFN- β -Antwort im Zytoplasma blocken zu können, muss das NiV-M am Lysin 258 ubiquitinyliert sein (Bharaj *et al.*, 2017), was bedeutet, dass das NiV-M erst nach dem Transport durch den Nukleus seine IFN-antagonistische Funktion ausüben kann. Der für die Ubiquitinylierung notwendige Kerntransit des NiV-Ms könnte also neben der Notwendigkeit für den NiV-M Transport an die Plasmamembran auch eine Rolle bei der Inhibierung der IFN- β -Antwort spielen.

In Bezug auf die Zelltyp-abhängigen Transport-Kinetiken könnte man vermuten, dass die Zellen, die das NiV-M effektiver aus dem Nukleus exportieren auch effektiver IFN- β blocken können. Dies würde dann zu einer reduzierten ISG-Expression führen, was die virale Replikation und die Bildung neuer Viruspartikel begünstigen würde. Um diese Hypothese zu untersuchen, müssten NiV-M und Kerntransport-defiziente M-Mutanten in den unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden, diese dann mit IFN- β stimuliert

und hinsichtlich ihrer IFN-Antwort analysiert werden. Weiter könnten Infektionsstudien mit dem wildtypischen NiV und dem M-defizienten NiV (Dietzel *et al.*, 2015) in den verschiedenen Zelltypen durchgeführt werden, um den Einfluss des NiV-Ms auf die IFN-Antwort im viralen Kontext zu untersuchen.

2. Die IB-Lokalisation an der Plasmamembran ist NiV-M abhängig

2.1 Die M-N Interaktion ist essentiell für IB-Lokalisation an der Plasmamembran

Die Matrixproteine der Paramyxoviren spielen eine bedeutende Rolle im Replikationszyklus der Paramyxoviren. So können die M-Proteine sowohl mit den RNPs, als auch mit den zytoplasmatischen Domänen der viralen Glykoproteine interagieren, sodass alle Bestandteile der neuen Viruspartikel an der Zelloberfläche akkumulieren und anschließend infektiöse Viruspartikel freigesetzt werden können (Takimoto und Portner, 2004; Harrison *et al.*, 2010). Es konnte für das Masernvirus (MV) M-Protein gezeigt werden, dass es über die Interaktion mit dem N-Protein für den Transport der RNPs an die Plasmamembran verantwortlich ist (Runkler *et al.*, 2007; Iwasaki *et al.*, 2009). An der Plasmamembran interagiert das MV-M mit den zytoplasmatischen Regionen der MV-Glykoproteine (Cathomen *et al.*, 1998; Tahara *et al.*, 2007).

Die NiV-Glykoproteine scheinen ebenfalls über die zytoplasmatischen Domänen mit dem NiV-M zu interagieren (Johnston *et al.*, 2017). Jedoch ist bisher nicht bekannt, wie die NiV-RNPs, bestehend aus den viralen Proteinen N, P, L und dem viralen Genom, an die Plasmamembran gelangen bzw. welche Voraussetzungen dafür gegeben sein müssen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl in der Infektion als auch in der Transfektion die Expression des NiV-Ms notwendig ist, damit die NiV-IB an der Plasmamembran akkumulieren (vgl. Abb. II.2). Dabei ist die Koloalisation der IB mit dem NiV-M an der Plasmamembran ein erster Hinweis auf eine M-N Interaktion, wie dies auch schon für MV bekannt ist (Iwasaki *et al.*, 2009). Im Gegensatz zum MV, bei dem das virale Genom essentiell für den RNP-Transport an die Plasmamembran ist (Liljeroos *et al.*, 2011), ist das NiV-Genom nicht erforderlich für die periphere IB-Lokalisation, da die IB auch in der Transfektion in Abwesenheit des NiV-Genoms an der Plasmamembran akkumulieren (vgl. Abb. II.2).

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass der Oberflächentransport des NiV-Ms unabhängig von NiV-F und NiV-G ist (Doktorarbeit Boris Lamp, 2013). Damit

übereinstimmend ist die Expression der beiden Glykoproteine und die damit verbundene Synzytien-Bildung nicht nötig für die periphere IB-Lokalisation (vgl. Abb. II.4 A). Dies spricht für unterschiedliche Transportwege und einen F-/G-unabhängigen Transport der RNPs an die Plasmamembran.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Interaktion von NiV-M mit den NiV-IB über NiV-N und nicht über NiV-P stattfindet (vgl. Abb. II.4 B und C). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Ray *et al.* (2016) überein, die eine potentielle NiV-M-Interaktionsdomäne am C-Terminus des NiV-Ns identifizieren konnten. Allerdings suggerieren diese Studien auch, dass es eventuell mehr als ein M-Interaktionsmotiv im NiV-N gibt, da die Interaktion von NiV-N mit NiV-M nach Deletion des beschriebenen Interaktionsmotives nicht vollständig aufgehoben ist (Ray *et al.*, 2016). Diese Ergebnisse unterstreichen letztendlich die entscheidende Rolle des NiV-Ms bei der peripheren IB-Lokalisation und somit für die Bildung neuer Viruspartikel an der Plasmamembran.

2.2 Die IB-Bildung an der Plasmamembran kann nur durch Henipavirus-M Proteine induziert werden

Matrixproteine anderer Paramyxoviren sind ebenfalls für den Transport ihrer RNPs an die Plasmamembran verantwortlich (Iwasaki *et al.*, 2009). Allerdings ist die M-RNP-Interaktion hierbei bisher kaum untersucht. Somit ist auch unklar, wie spezifisch die Interaktion des M-Proteins mit den RNPs ist. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die Akkumulation der NiV-RNPs bzw. -IBs an der Plasmamembran auch von Matrixproteinen nah- oder fern-verwandter Viren unterstützt wird. Dazu wurden in dieser Arbeit die Matrixproteine des Hendravirus (HeV), Masernvirus (MV), Tollwutvirus (RABV), Ebolavirus (EBOV) und Lassavirus (LASV) mit den Proteinen der NiV-IB koexprimiert. Nur das HeV-M konnte die IB-Lokalisation an der Plasmamembran unterstützen und dort mit den NiV-IB kolokalisieren (vgl. Abb. II.7 A). Die Matrixproteine des MV, RABV und EBOV konnten zwar mit den perinukleären NiV-IB kolokalisieren, jedoch nicht mehr die periphere IB-Akkumulation unterstützen (vgl. Abb. II.7 B-D). Somit ist die IB-Lokalisation an der Plasmamembran Henipavirus-M-spezifisch. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die N-Interaktionsdomäne in henipaviralen Matrixproteinen konserviert ist. Die Kolokalisation von nicht-henipaviralen Matrixproteinen mit den

perinukleären, nicht aber mit den peripheren NiV-IB, weist außerdem daraufhin, dass die Interaktion von Matrixproteinen mit diesen zwei IB-Subpopulationen von unterschiedlichen Voraussetzungen abhängt. Es ist zu bezweifeln, dass die Kolokalisation der Matrixproteine des MV, RABV und EBOV mit den perinukleären NiV-IB auf eine direkte Interaktion zurückzuführen ist. Wahrscheinlicher erscheint eine unspezifische Inkorporation dieser „fremden“ Matrixproteine in die NiV-IB, die eventuell einen Ablagerungsort von abundant exprimierten und nicht benötigten Proteinen darstellen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten weitere direkte Protein-Protein-Interaktionsstudien, beispielsweise Koimmunpräzipitationen, durchgeführt werden.

2.3 Die Voraussetzungen für die Kolokalisation von NiV-M mit perinukleären und peripheren IB unterscheiden sich

Es ist bereits bekannt, dass der nukleäre Transit des NiV-Ms für den Plasmamembrantransport nötig ist (Wang *et al.*, 2010; Pentecost *et al.*, 2015). In dieser Arbeit konnte nun mit Hilfe von verschiedener M-Transportmutanten gezeigt werden, dass der nukleäre Transit auch für die IB-Lokalisation bzw. -Bildung an der Plasmamembran erforderlich ist. Kernexport-Mutanten (M_{K258R} und M_{NESmut}), welche die Bildung peripherer IB nicht mehr unterstützen (vgl. Abb. II.8), waren interessanterweise noch in der Lage mit den perinukleären IB zu kolokalisieren. Dies bedeutet, dass die Inkorporation in perinukleäre IB schon geschieht, bevor die Kernexport-Mutanten in den Kern importiert werden. Denn wenn M_{K258R} oder M_{NESmut} erst einmal im Kern sind, können sie nicht mehr ins Zytoplasma gelangen. Dies bestätigt die Annahme, dass die Bildung und Kolokalisation mit den perinukleären und den peripheren IB von unterschiedlichen Faktoren abhängt (vgl. Kapitel III.2.2).

2.4 Die Kolokalisation mit den perinukleären IB könnte von der Membranassoziation des M-Proteins abhängen

Im Gegensatz zu den anderen getesteten Matrixproteinen, kolokalisiert das LASV-Z überhaupt nicht mit den NiV-IB (vgl. Abb. II.7 E). Der Unterschied des LASV-Z zu den anderen M-Proteinen ist, dass es wie auch andere Matrixproteine der Arenaviren an einem N-terminalen Glycin an Position 2 myristyliert wird. Erst durch die so verankerte

Fettsäure kann es mit zellulären Membranen assoziieren (Perez *et al.*, 2004; Strecker *et al.*, 2006; Capul *et al.*, 2007; Loureiro *et al.*, 2011). Die Membranassoziation der anderen untersuchten Matrixproteine wird dahingegen durch positiv geladene und Oberflächen-exponierte Aminosäuren vermittelt (vgl. Abb. I.4 B), die mit den negativ geladenen Phospholipiden der Membran feste elektrostatische Wechselwirkungen eingehen (Battisti *et al.*, 2012; Staehlin *et al.*, 2014). Obwohl es unwahrscheinlich ist, dass die perinukleären NiV-IB selbst Membran-assoziiert sind, denn die IB zeigten keinerlei Kolokalisation mit irgendwelchen zellulären Membranmarkern (vgl. Abb. II.3), könnte diese unterschiedliche Art der Membranassoziation eventuell dafür verantwortlich sein, dass das LASV-Z anders intrazellulär verteilt vorliegt und deshalb nicht in die perinukleären NiV-IB inkorporiert wird.

Die mögliche Bedeutung der M-Membranassoziation für die Lokalisation in peripheren IB wird auch durch die NiV-M Mutante NiV-M_{K258A} gestützt. Diese ist nicht mehr in der Lage mit den perinukleären IB zu kolokalisieren und kann nicht länger mit Membranen assoziieren (vgl. Abb. II.8 C und Abb. II.13 B). Für die Membranassoziation des EBOV VP40 scheint die Oligomerisierung eine Rolle zu spielen (Oda *et al.*, 2015). Allerdings zeigt die Mutante NiV-M_{K258A} keine abweichende Oligomerisierung (vgl. Abb. II.10), weswegen dies wahrscheinlich nicht der Grund für die fehlende Membranassoziation und die fehlende Kolokalisation mit den perinukleären NiV-IB ist. Um allerdings Unterschiede in der Oligomerisierung der Mutante NiV-M_{K258A} endgültig ausschließen zu können, müssen *native* Gelelektrophoresen durchgeführt werden. Nur so kann untersucht werden, ob sich die Stabilität der NiV-M_{K258A} Oligomere im Vergleich zu den anderen NiV-M Proteinen unterscheidet, was ein möglicher Grund für die fehlende Membranassoziation dieser Mutante sein kann.

Da nicht nur henipavirale M-Proteine, sondern auch Matrixproteine mit geringer Sequenzhomologie mit perinukleären IB kolokalisieren (EBOV-VP40, MV-M, RABV-M), ist es eher unwahrscheinlich, dass die Kolokalisation mit den perinukleären IB auf eine spezifische M-N -Interaktion zurückzuführen ist. Wahrscheinlicher ist, dass M-Proteine, die nicht effizient genug an die Plasmamembran transportiert werden, generell unspezifisch in perinukleären IB inkorporiert werden, insofern sie die richtige Membranassoziation zeigen. Um diese Hypothese jedoch weiter zu stützen, sollen in nächster Zeit Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Koimmunpräzipitation

durchgeführt werden, um eindeutig zu zeigen, welche viralen Matrixproteine und NiV-M-Mutanten noch direkt mit N bzw. RNPs interagieren können.

3. Perinukleäre und Plasmamembran-assoziierte IB sind von einander unabhängige Kompartimente

Geht man von einer unspezifischen Inkorporation aller möglicher M-Protein in perinukleäre IB aus, muss man vermuten, dass NiV-M keinen Einfluss auf die Bildung und Lokalisation der perinukleären IB hat und diese somit keine "Vorläufer"-IB der an der Plasmamembran lokalisierten, peripheren IB sein können. Deren Bildung ist vom Vorhandensein eines korrekt durch den Nukleus transportierten NiV-M abhängig und beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf einer spezifischen M-N-Interaktion. In einem solchen Modell, das auch am Ende dieser Diskussion dargestellt ist (vgl. Abb. III.1), entstehen periphere IB nicht durch eine M-vermittelte Relokalisation von perinukleären IB an die Plasmamembran, sondern bilden sich unabhängig, sobald funktionelle NiV-M nach dem Kernexport mit einzelnen RNPs interagieren, beides zusammen an die Plasmamembran transportiert wird und dort zu peripheren IB akkumuliert.

3.1 Perinukleäre IB bilden eigenes Kompartiment

Virale *inclusions* in der Nähe des Zellkerns konnten schon für eine Vielzahl von Viren nachgewiesen werden, wie beispielsweise für das Masernvirus (Huber *et al.*, 1991), das Marburgvirus (MARV, Becker *et al.*, 1998; Kolesnikova *et al.*, 2000), das Ebolavirus (EBOV, Hoenen *et al.*, 2012) und das Tollwutvirus (RABV, Negri *bodies*; Kristensson *et al.*, 1996). Die MARV-IB kolokalisieren mit dem Lysosom-assoziierten Membranprotein 1 (Lamp1, Marker des späten Endosoms und des Lysosoms), welches in den Transport der RNPs von den perinukleären IB zur Plasmamembran involviert ist (Dolnik *et al.*, 2015). Dies scheint für NiV-IB anders zu sein, denn in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NiV-IB mit keinem der untersuchten zellulären Kompartimente, frühe und späte Endosomen, Golgi, ER und Peroxisom, kolokalisieren (vgl. Abb II.3). NiV-IB induzieren auch keine Bildung von *stress granules* und kolokalisieren dann mit diesen, wie es zum Beispiel für das respiratorische Synzytialvirus (RSV) bekannt ist (Cervantes-Ortiz *et al.*, 2016). Dies deutet darauf hin, dass die perinukleären IB die Bildung eines neuen,

eigenen zellulären Kompartiment in der Zelle induzieren. Dieses Kompartiment könnte Aggresom-ähnlich sein, wie es für die IB des Herpes-simplex-Virus und des Tollwutvirus gezeigt werden konnte (Nozoe *et al.*, 2004; Lahaye *et al.*, 2009). Aggresomen sind Anhäufungen fehlgefalteter Proteine, die auftreten, wenn das Proteasom und die Chaperone nicht länger den fehlgefalteten Proteinen entgegenwirken können. Sie bilden sich am *microtubule organizing center* (MTOC) und sind von Vimentin umgeben. Zudem rekrutieren sie Mitochondrien, um die Energie für den Proteinabbau bereitstellen zu können (Johnston *et al.*, 1998; Garcia-Mata *et al.*, 1999). Auch wenn die NiV-IB die Morphologie von Aggresom-ähnlichen Strukturen aufweisen, scheinen sie sich von den allgemeinen Aggresomen zu unterscheiden. So verhindert die Zerstörung der Mikrotubuli die Bildung von Aggresomen (Johnston *et al.*, 1998; Garcia-Mata *et al.*, 1999), während dies keinen Einfluss auf die IB-Bildung hat (vgl. Abb. II.12 A). Allerdings müssen zur näheren Charakterisierung der NiV-IB noch weitere Versuche gemacht werden, wie Kollokalisationsstudien von NiV-IB mit den Aggresomen-Markern, Vimentin, oder γ -Tubulin, einem Zentrosomen-/MTOC-Marker.

3.2 Transkription und Replikation in räumlicher Nähe zu den perinukleären IB

Bei Filoviren stellen die viralen IB den Ort der viralen Transkription und Replikation dar (Hoenen *et al.*, 2012), von denen ausgehend RNPs freigesetzt und anschließend Aktin-abhängig zur Plasmamembran transportiert werden (Schudt *et al.*, 2013 und 2015). Letzteres konnten durch EM-Studien und Lebendzellmikroskopie fluoreszenz-markierter filoviraler RNPs belegt werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten *live cell imaging*-Analysen konnte bislang allerdings keine Freisetzung von RNPs aus den NiV-IB beobachtet werden. Die kleinen perinukleären IB „verschmelzen“ über die Zeit zu immer größeren IB, verbleiben aber perinukleär, wobei sie zufällig in der Zelle verteilt sind (vgl. Abb. II.5 A). Womöglich sind die in dieser Arbeit gewählten Intervalle der Einzelaufnahmen der *live cell imaging*-Analysen zu groß, sodass eine Freisetzung von RNPs aus den IB nur schwer oder gar nicht zu detektieren war. Aus diesem Grund müssen diese Studien mit deutlich kürzeren Intervallen und einer Fokussierung auf die IB wiederholt werden.

In den EM-Analysen der perinukleären NiV-IB wurde beobachtet (vgl. Abb. II.6 A-C), dass sich in räumlicher Nähe zu den NiV-IB viele Ribosomen oder Polysomen befinden (vgl.

Abb. II.6 C, schwarze Pfeile). Dies könnte daraufhin weisen, dass die Transkription und Replikation eventuell nicht innerhalb der NiV-IB abläuft, aber womöglich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den NiV-IB geschehen könnte. Dabei könnte die räumliche Nähe der frisch an Polysomen synthetisierten Proteine die Interaktion der Proteine vereinfachen. Liegt in NiV-infizierten Zellen dann genomische RNA vor, kann diese hier durch NiV-N, NiV-P und NiV-L enkapsidiert werden, wodurch dann funktionelle RNPs gebildet werden. Im Falle einer N und P-Koexpression ohne viralen Kontext, würden die beiden Proteine zelluläre RNA enkapsidieren und so RNP-ähnliche helikale Strukturen bilden. Sowohl in infizierten als auch in transfizierten Zellen würden überschüssige Proteine oder inkomplette RNPs dann „abgelagert“ werden und so die perinukleären IB bilden. Um dieses Modell näher zu untersuchen, könnten die Ribosomen angefärbt werden und überprüft werden, ob sie mit den IB assoziiert vorliegen. Des Weiteren könnte durch *in-situ*-Hybridisierungen (RNA-FISH) untersucht werden, ob RNA in den NiV-IB detektierbar ist oder nur in der direkten Nachbarschaft zu den NiV-IB vorliegt.

3.3 Die Bildung peripherer IB an der Plasmamembran resultiert aus einem M-abhängigen RNP-Transport

Das Masern (MV) M-Protein umhüllt die zytoplasmatischen MV-RNPs und transportiert diese dann an die Plasmamembran (Lijeroos *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu ist für Filoviren beschrieben, dass VP40 zwar mit den perinukleären IB kolokalisiert, aber VP40 und RNPs unabhängig an die Plasmamembran transportiert werden (Schudt *et al.*, 2013 und 2015). Erst an der Plasmamembran kolokalisieren VP40 und RNPs wieder miteinander. Beides wären mögliche Szenarien für den NiV-M und NiV-RNP Transport an die Plasmamembran. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die großen peripheren NiV-IB nur in Anwesenheit von funktionellem NiV-M an der Plasmamembran bilden, während sich die perinukleären IB auch ohne das M formieren (vgl. Abb. II.5). In den *live cell imaging*-Studien ohne das NiV-M konnte keine Relokalisierung der perinukleären IB an die Plasmamembran beobachtet werden (vgl. Abb. II.5 A). Auch wenn dies bislang noch nicht direkt gezeigt werden konnte, weil einzelne RNPs nicht mittels Immunfluoreszenz detektiert werden können, sprechen alle bisherigen Ergebnisse für einen M-abhängigen aktiven Transport der RNPs an die

Plasmamembran. Diese akkumulieren dann zu großen peripheren IB. Hierzu passen auch die ultrastrukturellen (EM)-Analysen, die in Zusammenarbeit mit Dr. Larissa Kolesnikowa durchgeführt wurden. Diese zeigen, dass sich die Strukturen der perinukleären NiV-IB und der peripheren NiV-IB morphologisch deutlich voneinander unterscheiden (vgl. Abb. II.6). Um zu zeigen, dass das NiV-M die RNPs an die Plasmamembran transportiert, müssten *live cell imaging*-Analysen in Anwesenheit des Kernexport-Inhibitors Leptomycin B (LMB) durchgeführt werden. LMB bindet kovalent und irreversibel an *chromosomal region maintenance 1* (Crm1), welches für nukleären Export des NiV-Ms verantwortlich ist (Sun *et al.*, 2013; Bauer *et al.*, 2014; Pentecost *et al.*, 2015). Die Zugabe des LMBs müsste erfolgen, sobald eine NiV-M Akkumulation an der Plasmamembran und erste kleine perinukleäre IB im *live cell imaging* zu sehen sind. So könnte kein weiteres NiV-M aus dem Kern exportiert und an die Plasmamembran transportiert werden. Werden RNPs getrennt vom M transportiert und braucht es nur eine gewisse Menge an NiV-M an der Plasmamembran, damit dort RNPs binden und akkumulieren können, sollten trotz der Hemmung des M-Transports durch LMB die peripheren IB weiter an Größe zunehmen. Sollte dies nicht der Fall sein, deutet dies auf einen gemeinsamen M-abhängigen Transport der RNP an die Plasmamembran hin.

3.4 Rekombinate NiV mit einem Transport-defekten NiV-M haben eine deutlich reduzierte Infektiosität

Während für einige Paramyxoviren die Generierung von M-defizienten Viren nicht erfolgreich war (Mottet *et al.*, 1996 und 2007; Zhang *et al.*, 2014), konnten für das Masernvirus (MV) und das humane respiratorische Synzytialvirus (hRSV) M-defizienten Viren hergestellt werden (Cathomen *et al.*, 1998; Mitra *et al.*, 2012). Neben dem erwarteten Assembly-Defekt zeigten M-defiziente MV eine erhöhte Fusionsaktivität, denn ohne M wird die MV-Glykoprotein vermittelte Zell-Zell-Fusion nicht mehr herunter reguliert (Cathomen *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 2002). Die Deletion des M-Proteins beim hRSV-M führte zwar auch zu einem Assembly-Defekt, aber zu keiner verbesserten Zell-Zell-Fusion (Mitra *et al.*, 2012). Dies legt nahe, dass die paramyxoviralen M-Proteine einen unterschiedlichen Einfluss auf die Zell-Zell-Fusion haben.

Ein kürzlich erzeugtes M-defizientes rekombinantes NiV (rNiVΔM) weist, wie die anderen M-defizienten Paramyxoviren, ein gestörtes Assembly auf und es werden große

Mengen nicht-infektiöser Viruspartikel freigesetzt (Dietzel *et al.*, 2015). Wie die M-defizienten Masernviren besitzt rNiV Δ M auch eine leicht erhöhte Fusogenität (Dietzel *et al.*, 2015). Ein ähnlicher Phänotyp zeigte sich auch für das in dieser Arbeit untersuchte rNiV-M_{NESmut}, das die Transport-defekte Kernexport-Mutante M_{NESmut} kodiert. In rNiV-M_{NESmut}-infizierten Zellen konnte eine signifikant größere Synzytien-Bildung im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (vgl. Abb. II.9 B). Dies beweist, dass in infizierten Zellen NiV-M nicht nur exprimiert werden muss, sondern auch an der Plasmamembran akkumulieren muss, um die F/G-vermittelte Synzytien-Bildung herunterregulieren zu können.

Wie in der Transfektion führte die Expression der Kernexport-Mutante M_{NESmut} auch im viralen Kontext zu einer Kolokalisation mit den perinukleären IB. Und auch in der Infektion konnte M_{NESmut} den RNP-Transport an die Plasmamembran nicht unterstützen (vgl. Abb. II.9 A). Somit konnten die Ergebnisse zur IB-Lokalisation aus der Transfektion in der Infektion bestätigt werden (vgl. Abb. II.8 C). Aufgrund des Transport-defekten M-Proteins wuchs rNiV-M_{NESmut} zu deutlich geringeren Titern als das Wildtyp-Virus. Gleichzeitig war aber eine erhöhte RNA-Menge im Überstand rNiV-M_{NESmut}-infizierter Zellen detektierbar, was auf eine deutlich reduzierte relative Partikelinfektiosität hinwies (vgl. Abb. II. 9). Die Expression eines Kerntransport-defizienten NiV-M im viralen Kontext resultiert also in einer erhöhten Fusogenität, einem deutlichen Assembly-Defekt und einer signifikant reduzierten Partikelinfektiosität. Dies stellt keinen Unterschied zu der Infektion mit einem vollständig M-defizienten NiV dar (Dietzel *et al.*, 2015). Somit ist die Expression eines Kerntransport-defizienten NiV-M in einer produktiven Virusinfektion mit der Abwesenheit des NiV-Ms gleichzusetzen. Dies unterstreicht nochmal die Notwendigkeit eines funktionellen intrazellulären Transports des NiV-Ms für die Bildung von infektiösen Viruspartikeln.

Mit Hilfe von rNiV-M_{NESmut} könnte in Zukunft untersucht werden, welchen Einfluss die Expression eines Kerntransport-defekten NiV-M auf die IFN- β -Antwort während einer Virusinfektion hat. Bisher konnte die Reduktion der IFN-Antwort in der Infektion nur in der An- und Abwesenheit des NiV-Ms untersucht werden. Die Arbeiten von Bharaj *et al.* (2017) zur Hemmung der IFN-Antwort durch das NiV-M können vermuten lassen, dass für die Inhibierung der IFN- β -Antwort der nukleäre Transit nötig ist. Damit wäre der M-Transport durch den Zellkern nicht nur wichtig für den RNP-Transport und das Assembly

an die Plasmamembran, sondern neben dem W-Protein auch essentiell für die Herunterregulierung der antiviralen IFN-Antwort.

4. Die Rolle des Zytoskeletts beim NiV-M abhängigen RNP-Transport an die Plasmamembran

Bei vielen Paramyxoviren spielt das Zytoskelett eine wichtige Rolle in der Virusreplikation und -freisetzung. Während Aktin für die Replikation des humanen Parainfluenzavirus 3 (hPIV 3) wichtig ist, sind Mikrotubuli (MT) essentiell für dessen Budding-Prozess (Gupta *et al.*, 1998; Bose *et al.*, 2001). Durch die Mutation einer vermutlichen Aktinbindedomäne im Sendaivirus M-Protein (SeV-M) wurde die VLP-Freisetzung signifikant reduziert. Dies lässt darauf schließen, dass die Aktinbindung für das SeV Budding notwendig ist (Takimoto *et al.*, 2001). Auch für Masernviren (MV) ist das Aktinzytoskelett wichtig, denn die M-RNP-Komplexe nutzen Aktinfilamente für den Plasmamembrantransport und die Aktindynamik ist wichtig für das Virus-Budding (Dietzel *et al.*, 2013). Man könnte vermuten, dass Aktin auch in der NiV-Infektion eine Rolle spielt, wobei zu Beginn dieser Arbeit völlig unklar war, welchen Einfluss das Zytoskelett auf den NiV-M Transport oder die Lokalisation der IB hat.

Während die Zerstörung der Mikrotubuli durch Nocodazol keinen Einfluss auf den NiV-M Transport an die Plasmamembran hat, führt eine Zerstörung der Aktinfilamente durch Cytochalasin D zu einer Retention des NiV-Ms im Zytoplasma (vgl. Abb. II.11) und verhinderte auch die Bildung peripherer IB an der Plasmamembran (vgl. Abb. II.12). Die Zerstörung des Aktinzytoskeletts oder der Mikrotubuli stört weder die Bildung der perinukleären IB noch die Koloalisation vom M mit diesen IB (vgl. Abb. II.12). Somit scheinen Aktinfilamente nur für den Transport vom M oder M-RNP-Komplexen an die Plasmamembran und die davon abhängige Bildung peripherer IB nötig zu sein. Auch wenn noch unklar ist, wie das NiV-M mit dem Aktinzytoskelett interagiert, könnte wie beim respiratorischen Synzytialvirus (RSV), Myosin beteiligt sein. Für RSV wurde gezeigt, dass der RNP-Transport zur Plasmamembran Myosin-abhängig entlang des Aktinzytoskeletts verläuft (Santangelo *et al.*, 2007). Neben Myosin und Aktin selbst könnten aber auch Proteine der Ezrin-Radixin-Moesin-Familie (ERM) mögliche Interaktionspartner des NiV-Ms darstellen. Um den Aktin-abhängigen NiV-M Transport

in Zukunft genauer zu charakterisieren, ist geplant, in Analogie zu früheren Studien der Arbeitsgruppe mit Masernviren (Dietzel *et al.*, 2013) NiV-Infektionsstudien mit verschiedenen Inhibitoren (Latrunculin A, Cytochalasin D, Jasplaskinolide) durchzuführen, um zu klären, welchen Einfluss das Aktinzytoskelett auf die Virusreplikation und -freisetzung hat.

5. Der C-Terminus des NiV-Ms ist essentiell für die Akkumulation an der Plasmamembran

Untersuchungen des Sendaivirus (SeV) und des humanen Parainfluenzavirus 3 (hPIV 3) hatten gezeigt, dass die C-terminalen Aminosäuren (AS) der Matrixproteine essentiell für das Budding der beiden Viren sind. Dabei scheinen die C-Termini dieser beiden Paramyxovirus-M-Proteine aber nicht notwendig für die generelle Membranassoziation zu sein, anders als die C-terminale Region des Ebolavirus VP40 (Takimoto *et al.*, 2001; Stahelin, 2014). Um zu testen, ob der C-Terminus des NiV-Ms eine funktionelle Bedeutung hat, wurde in dieser Arbeit die Mutante NiV-M_{347-352A} untersucht, in der die letzten sechs AS zu Alaninen mutiert sind. Die Mutation hatte keinen Einfluss auf die Membranassoziation des Proteins (vgl. Abb. II.13 B). Allerdings konnte NiV-M_{347-352A} nicht mehr mit dem Aktinzytokortex kolokalisieren und unterstützte auch keine IB-Bildung an der Plasmamembran mehr (vgl. Abb. II.13 C und D). Somit könnten die C-terminalen basischen AS eine Rolle bei Interaktion des NiV-Ms mit dem Zytokortex zu spielen, welche wahrscheinlich essentiell für die Akkumulation des NiV-Ms an der Plasmamembran und damit auch für Entstehung peripherer IB ist. Für SeV und hPIV 3 wurde postuliert, dass der C-Terminus eine potentielle Aktinbindedomäne darstellt. Allerdings weicht die AS-Sequenz des bekannten Aktinbindedomäne-Motivs (KLKK) von der AS-Sequenz der C-Termini von SeV und hPIV 3 (KIRK) ab und mehr noch von der AS-Sequenz im NiV-M (RILK) (Takimoto *et al.*, 2001). Aus diesem Grund muss durch weitere Mutations- und Interaktionsanalysen geklärt werden, ob es sich bei dem C-Terminus des NiV-Ms tatsächlich um eine direkte Aktinbindedomäne handelt.

6. Modell des M-abhängigen RNP-Transports an die Plasmamembran

Abschließend sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zum NiV-M und RNP-Transport sowie zur IB-Bildung in einem Modell zusammengefasst werden (dargestellt in Abb. III.1):

Die NiV-Proteine N, P, L und M werden an freien Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert (1). Während das N die virale RNA enkapsidiert und dann mit P und L die RNPs bildet (1a), wird das NiV-M über eine zweigeteilte NLS in den Kern importiert (1b). Im Kern wird das NiV-M dann an Lysin 258 (mono-) ubiquitinyliert (2). Der Kernexport erfolgt nach der Ubiquitinylierung über klassische NES-Signale im M-Protein (3). Exportiertes M kann nicht wieder zurück in den Kern gelangen, da der Ubiquitin-Rest an Lysin 258 das NLS an dieser Stelle maskiert. Nach dem nukleären Transit gelangt ein Teil des NiV-Ms durch einen Aktin-abhängigen Transport an die Plasmamembran (4) und bildet dort eine wahrscheinlich eng mit dem Aktinzytokortex assoziierte M-Matrix aus (5). Ein Teil des NiV-Ms trifft auf die bereits gebildeten RNPs (6), interagiert mit diesen und transportiert sie dann, ebenfalls Aktin-abhängig, an die Plasmamembran (7). An der Plasmamembran akkumulieren die M-RNP-Komplexe dann an der schon gebildeten M-Matrix, wodurch die großen peripheren IB entstehen (8). Hier initiiert das NiV-M dann die für die Freisetzung infektiöser Viren finalen Assembly- und Budding-Prozesse.

Da Nukleokapsidproteine in infizierten Zellen generell in sehr großen Mengen produziert werden und nur ein Bruchteil davon letztendlich in infektiöse Viruspartikel inkorporiert werden, akkumulieren die N- und P-Proteine, die nicht in die funktionellen RNPs assemblieren und M-abhängig an die Plasmamembran gelangen, in räumlicher Nähe der Ribosomen/Polysomen, an denen die Translation der Virusproteine stattfindet. So entstehen dann die perinukleären IB (9). Da transportdefekte NiV-M Mutanten und auch Matrixproteine anderer Viren in den perinukleären IB akkumulieren, kann vermutet werden, dass die perinukleären IB keine funktionelle Bedeutung für die Bildung infektiöser Viren haben, sondern vielmehr Virus-induzierte Aggresom-ähnliche „Kompartimente“ darstellen, in die überschüssige oder defekte zytoplasmatische Virusproteine abgelagert werden.

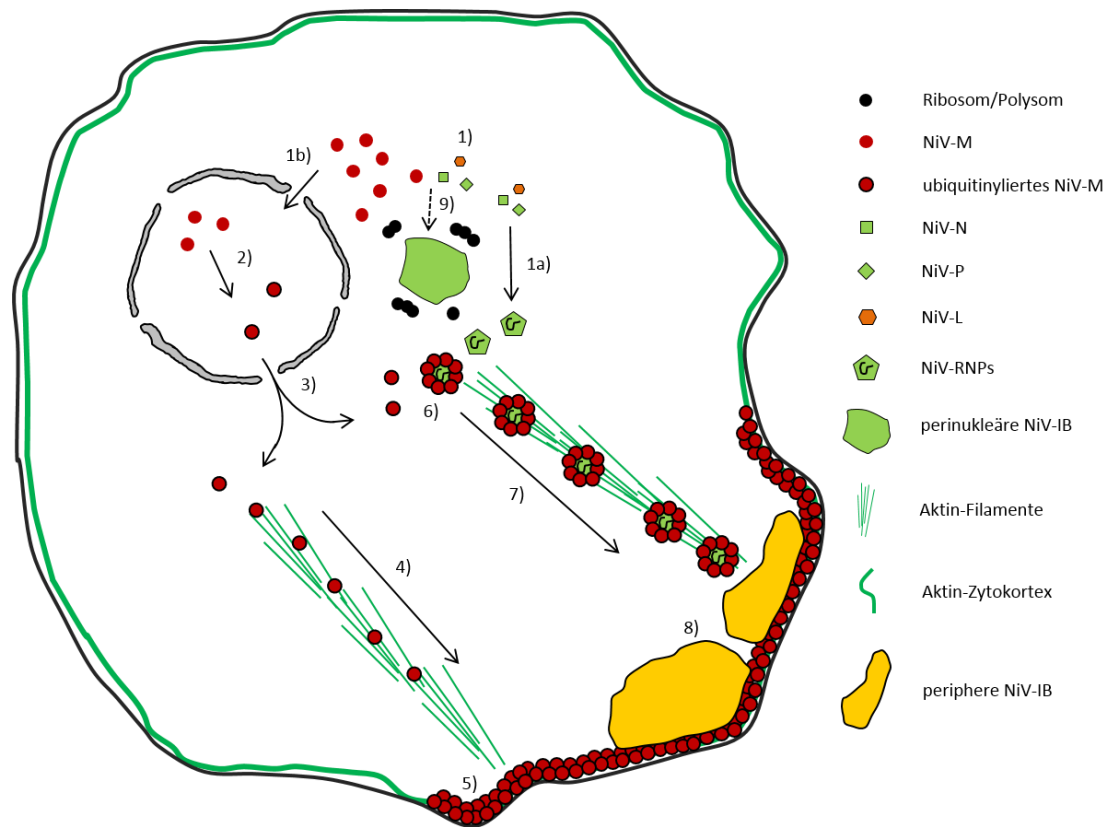


Abbildung III.1: Modell zum NiV-M und Aktin-abhängigen NiV-RNP Transport an die Plasmamembran.

IV. Methoden

1. Molekularbiologische Methoden

1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung bestimmter DNA und RNA Bereiche, die durch einen *forward*- und einen *reverse*-Primer begrenzt sind. Bei den Primern handelt es sich um Oligonukleotide, die sich an ihr einzelsträngiges *reverse*s Komplement in der Ausgangs-DNA oder -RNA anlagern und somit für die Polymerasen als Startpunkt für die DNA-Synthese dienen. Somit lassen sich aufgrund der spezifischen Sequenzen für die Primerpaare definierter Bereiche eines Doppelstranges amplifizieren. Neben der Ausgangs-DNA (*template*) und den beiden Primern wird zur Amplifikation eine hitzestabile DNA-Polymerase sowie Deoxyribonukleotidphosphate (dNTPs) verwendet, um einen zum Ausgangsstrang komplementären Strang zu synthetisieren. Die PCR durchläuft mehrere Zyklen der Replikation, die jeweils aus drei Phasen bestehen. Die erste Phase ist die Denaturierung, bei der die DNA-Doppelstränge des *templates* bei einer Temperatur von 97 °C aufgetrennt werden. In der *annealing*-Phase binden die Primer bei niedrigeren Temperaturen an die entsprechenden Bereiche des Einzelstranges und bilden den Startpunkt der dritten Phase, der Elongationsphase. Während dieser wird der Einzelstrang, beginnend am Primer, von der Polymerase zu einem Doppelstrang ergänzt. Als Polymerase wurde in dieser Arbeit im Wesentlichen die *Velocity* DNA-Polymerase (Bioline) verwendet. Durch die 3'-5'-Exonukleasefunktion kann die Polymerase falsch eingebaute Nukleotide aus dem Strang entfernen und durch die korrekten Nukleotide ersetzen. In dieser Arbeit wurde die PCR dazu verwendet, um N- und C-terminale Restriktionsenzymschnittstellen an das NiV-N und NiV-P (vgl. Kapitel IV.1.5) anzufügen und um ein Membran-assoziiertes NiV-M_{K258A}-Konstrukt zu klonieren (vgl. Kapitel IV.1.7).

1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Um bei der Klonierung die erhaltenen DNA-Fragmente anhand ihrer Größe unterscheiden zu können, wurden mittels Gelelektrophorese die DNA-Fragmente in einem Spannungsfeld ihrer Größe nach aufzutrennt. Bedingt durch die negative Ladung der Phosphatgruppen der DNA bewegt sich die DNA zur Anode (+ Pol). Dabei wandern

kleine DNA-Fragmente schneller durch das Agarosegel als größere Fragmente. Anhand eines mitgeführten Größenstandards (Marker; DNA Ladder Mix, ThermoFisher) lässt sich die Größe der aufgetragenen DNA-Fragmente bestimmen. In dieser Arbeit wurden 1 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 0,5-fachem TBE-Puffer aufgekocht bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf Handwärme wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration: $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) zugesetzt, damit die DNA-Fragmente später im Gel detektiert werden können. Die Agaroselösung wurde in einen Gelschlitten gegossen, in dem ein Gelkamm für die Probenaschen eingesetzt war. Der Kamm wurde aus dem erstarrten Gel gezogen und das Gel mit dem Schlitten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 0,5-fachem TBE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 6-fachem Probenpuffer versetzt und wie der Marker in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 140 V für 60 min durchgeführt. Anschließend konnten die DNA-Fragmente unter UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) ausgeschnitten und im Anschluss dokumentiert werden (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad; $\lambda = 254 \text{ nm}$). Die ausgeschnittenen DNA-Fragmente wurden mit dem Gel Extraction Kit (Omega) aus dem Gel eluiert, in dem die DNA-enthaltene Agarose bei 60°C geschmolzen wurde und auf eine Silikamembran-Säule gegeben wurde. Die unter Hochsalzbedingungen gebundene DNA wird nach mehreren Waschschritten in $50 \mu\text{l dH}_2\text{O}$ eluiert.

1.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um bakterielle Enzyme, die durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung die Spaltung von doppelsträngiger DNA vermitteln. Durch die Restriktion entstehen DNA-Fragmente bestimmter Größen mit überhängenden (*sticky ends*) oder nicht überhängenden Enden (*blunt ends*). Mit Hilfe von Restriktionsenzymen kann somit doppelsträngige DNA in Fragmente definierter Länge geschnitten werden, die nach Auftrennung im Agarosegel (vgl. Kapitel IV.1.2) ein charakteristisches Bandenmuster ergeben und verwendet werden. Das geschnittene DNA-Segment (*insert*) wird dann in einen Expressionsvektor (Ziel-Plasmid) eingefügt. Für einen Restriktionsverdau wurden $5 \mu\text{l}$ Plasmid und $30 \mu\text{l}$ PCR-Produkt verwendet. Generell wurden 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym zu dem Ansatz gegeben. Die Puffer wurden, wie vom Hersteller angegeben, eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 37°C

für 3 bis 4 h inkubiert und anschließend die verdaute DNA in 6-fachem Probenpuffer aufgenommen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Kapitel IV 1.2).

1.4 Vektorverdau, Dephosphorylierung und Ligation

Um ein DNA-Fragment (*insert*) in einen Expressionsvektor einbringen zu können, muss sowohl der Vektor als auch das *insert* mit einem Restriktionsverdau geschnitten werden (vgl. Kapitel IV.1.3). Um zu verhindern, dass der linearisierte Vektor wieder religiert, wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) behandelt. Hierbei entfernt die SAP die Phosphatgruppen am 5'-Ende des linearisierten Vektors und verhindert so die Religation. Dazu wurden 5 U SAP und die entsprechende Menge an SAP-Puffer zur extrahierten DNA (vgl. Kapitel IV.1.2) gegeben und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der SAP für 15 min bei 65 °C. Zum Verbinden des *insert* mit dem linearisierten Vektor wurden DNA-Ligasen verwendet, die freie 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatreste unter ATP-Verbrauch durch eine Phosphodiesterbindung kovalent miteinander verknüpfen. Hierfür wurden Vektor und das *insert* in einem molaren Verhältnis von 1 zu 3 gemischt und über Nacht mit 10 U T4-DNA-Ligase bei 4 °C inkubiert. Die DNA-Menge wurde mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. Kapitel IV.1.2) geschätzt. Anschließend wurden die Ligationsansätze mittels Hitzeschocktransformation in kompetente *Escherichia coli* (E. coli) transformiert (vgl. Kapitel IV.1.8).

1.5 Umklonierung des Nipahvirus Nukleoproteins und Phosphoproteins

Zur Untersuchung der Lokalisation und des Transportes der NiV *inclusion bodies* (IB) wurden geeignete NiV-N und NiV-P exprimierende Vektoren benötigt. Bisher wurden beide Plasmide als Helferplasmide beim *rescue* von rekombinaten Viren in einem T7-abhängigen Expressionsvektor genutzt. Da zur Expression des NiV-Ms ein pCG-Vektor genutzt wird, sollten im Rahmen dieser Arbeit NiV-N und NiV-P ebenfalls in den pCG-Vektor kloniert werden. Die Möglichkeiten geeigneter Restriktionschnittstellen im pCG-Vektor waren jedoch sehr begrenzt, sodass zuerst eine weitere *multiple cloning site* (MCS) in den pCG-Vektor kloniert wurde. Dazu wurde die MCS aus dem pCS5-Vektor mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *PacI* isoliert und in den ebenfalls mit *BamHI* und *PacI* behandelten pCG-Vektor ligiert (vgl. Kapitel IV.1.4). In diesen neu klonierten

pCG-MCS-Vektor wurden anschließend das NiV-N- und NiV-P-Gen kloniert. Die für die PCR verwendeten Plasmide und Primer und die Bezeichnung der aus der Mutagenese resultierenden Plasmide sind in Tabelle III.1 aufgeführt.

Tabelle III.1: Verwendete *templates* und Primer zur Umklonierung von NiV-N und -P.

Plasmid (<i>template</i>)	Primer	Plasmid
pTM1-NiV N	NiV N_NotI-F NiV N_PacI-R	pCG-MCS-NiV-N
pTM1-NiV P	NiV P_NotI-F NiV P_NheI-R	pCG-MCS-NiV-P

Für die PCRs wurde folgender Reaktionsansatz verwendet.

Reaktionsansatz der PCR:	250 ng	<i>template</i>
	1 µl	<i>forward</i> -Primer (10 µM)
	1 µl	<i>reverse</i> -Primer (10 µM)
	1 µl	dNTPs (10 µM)
	10 µl	5x HiFi Velocity Puffer
	35,5 µl	dH ₂ O
	0,5 µl	<i>Velocity</i> -Polymerase (1 U)

Die Zyklusparameter waren wie folgt:

Denaturierung	97 °C	5 min
Beginn der 30 Zyklen:		
Denaturierung	97 °C	30 sec
<i>annealing</i>	54 °C	45 sec
Elongation	72 °C	45 sec
Synthese nach dem letzten Zyklus	72 °C	10 min
	8 °C	∞

Die Produkte der PCR wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und die korrekten DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert (vgl. Kapitel IV.1.2). Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *NotI*-HF/*PacI* oder *NotI*-HF/*NheI*

behandelt (vgl. Kapitel IV.1.3) und in den Vektor pCG-MCS ligiert (vgl. Kapitel IV.1.4). Mit Hilfe einer *extended-hotshot* Sequenzierung der Firma Seqlab (Göttingen) konnten die Sequenzen der neu konstruierten Vektoren überprüft werden. So konnte im Rahmen dieser Arbeit ein NiV-N (pCG-MCS-NiV-N) und NiV-P (pCG-MCS-NiV-P) exprimierender pCG-Vektor hergestellt werden.

1.6 Die gerichtete Mutagenese (*Site-Directed Mutagenesis*) zur Herstellung der mutierten NiV-M-Konstrukte

In früheren Publikationen wurde gezeigt, dass ein Transport durch den Kern für das NiV-M notwendig ist, um an die Plasmamembran zu gelangen (Wang *et al.*, 2010 und Pentecost *et al.*, 2015). Um den Zelltyp-spezifischen NiV-M-Transport oder den Einfluss des NiV-Ms auf die Verteilung der NiV-IB untersuchen zu können, wurden verschiedene Transport-defekte M-Mutanten im Rahmen dieser Arbeit kloniert. Diese Mutationen wurden mit Hilfe der gerichteten Mutagenese (Q5® *Site-Directed Mutagenesis* Kit, NEB) in das Wildtyp NiV-M-Gen (pCG-NiV-M_{Kozak}) eingebracht. Durch die Gestaltung der Primer ist es möglich mit der gerichteten Mutagenese Deletionen, Insertionen oder Substitutionen gezielt in doppelsträngige Plasmid-DNA einzubringen (Abb. IV.1).

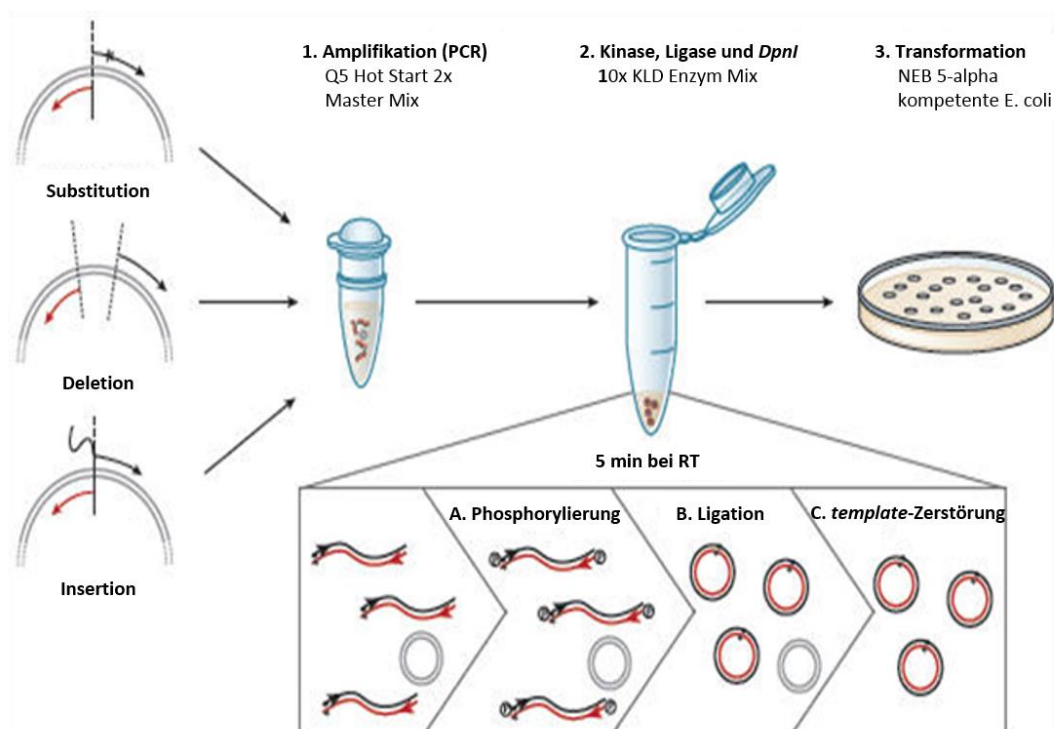


Abbildung IV.1: Schematische Darstellung der gerichteten Mutagenese mittels Site-Directed Mutagenesis Kit (Abbildung von der NEB Homepage; <https://www.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit>).

Die Primer wurden mit Hilfe der NEB Homepage (<http://nebasechanger.neb.com/>) konstruiert. Die PCR (vgl. Kapitel IV.1.1) wurde ausgehend vom *template* (pCG-NiV-M_{Kozak}) und mit spezifischen Primern, die die gewünschten Mutationen tragen und zueinander *reverse*-komplementär sind, durchgeführt. Die für die PCR verwendeten Plasmide und Primer (Sequenzen im Materialteil gelistet) und die Bezeichnung der aus der Mutagenese resultierenden Plasmide sind in Tabelle III.2 aufgeführt.

Tabelle III.2: Verwendete Primer zur Herstellung der NiV-M-Mutanten.

Plasmid (<i>template</i>)	Primer	Plasmid (NiV-M-Mutanten)
pCG-NiV-M _{Kozak}	K258A_F K258A_R	pCG-NiV-M _{K258A}
	K258R_F K258R_R	pCG-NiV-M _{K258R}
	MNLS_b1/2K_F MNLS_b1/2K_R	pCG-NiV-M _{NLSb1/2K}
	ΔNES_F ΔNES-R	pCG-NiV-M _{NESmut}
	nNiM 348-352A_F nNiM 348-352A_R	pCG-NiV-M _{347-352A}

Alle Reaktionsansätze und Zyklusparameter wurden nach Hersteller-Angaben durchgeführt.

Reaktionsansatz der PCR:	10 ng	<i>template</i>
	1,25 µl	<i>forward</i> -Primer (10 µM)
	1,25 µl	<i>reverse</i> -Primer (10 µM)
	9 µl	dH ₂ O
	12,5 µl	Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix

Die Zyklusparameter waren wie folgt:

Denaturierung	98 °C	30 sec
---------------	-------	--------

Beginn der 25 Zyklen:

Denaturierung	98 °C	30 sec
<i>annealing</i>	50 °C	30 sec
Elongation	72 °C	3,5 min
Synthese nach dem letzten Zyklus	72 °C	2 min
	8 °C	∞

Bei dieser PCR wurde mittels der Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase ein mutiertes, doppelsträngiges Plasmid amplifiziert, welches allerdings weiterhin einen Doppelstrangbruch aufweist (Abb. IV.1 2A). Durch die Zugabe des KLD-Enzym-Mixes, welcher Kinase, Ligase und DpnI beinhaltet, wurde die methylierte oder halbmethylierte Ausgangs-DNA geschnitten und somit zerstört. Außerdem wurde die amplifizierte, mutierte, doppelsträngige und linearisierte Plasmid-DNA ligiert (Abb. IV.1; 2B). Die Transformation wurde in NEB® 5-alpha Competent E. coli (*high efficiency*) Bakterien nach den Herstellerangaben durchgeführt und anschließend erfolgte die Selektion der transformierten Bakterien durch die auf dem Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz und in Kulturmedium mit dem entsprechenden Antibiotika. Nach der DNA-Präparation (vgl. Kapitel IV.1.9) wurde der für das M-Protein kodierende Bereich mittels *extended-hotshot* Sequenzierung (Firma SeqLab, Göttingen) überprüft. Auf diese Weise wurden die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide pCG-NiV-M_{K258A}, pCG-NiV-M_{K258R}, pCG-NiV-M_{NLSb1/2K}, pCG-NiV-M_{NESmut} und pCG-NiV-M_{347-352A} hergestellt.

1.7 Herstellung eines Membran-assoziierten NiV-M_{K258A}-Konstrukts

Wang *et al.* (2010) konnten zeigen, dass NiV-M_{K258A} nicht mehr an Membranen assoziieren kann. Fügt man der NiV-M_{K258A} N-terminal jedoch ein Membran-*targeting*-Signal (S15) aus dem c-SRC Protein an, so war diese Mutante wieder in der Lage an Membranen zu assoziieren (Wang *et al.*, 2010). Dieses 15 Aminosäure-langes Peptid (S15) beinhaltet ein N-terminales Glycin (G²), das myristoyliert wird und dafür verantwortlich ist, dass S15-haltige Protein mit den *non-raft* Fraktionen der Membranen assoziieren können (Shenoy-Scaria *et al.*, 1993 und Rodgers *et al.*, 2002). Um die Rolle der NiV-M Membranassoziation untersuchen zu können, wurde ein S15-Fusionsprotein im Rahmen dieser Arbeit generiert. Dazu wurde mittels einer PCR (vgl. Kapitel IV.1.1)

ausgehend vom pCG-NiV-M_{K258A} (*template*) und dem Primerpaar S15-M_Sall-F/NiV M_PstI-R die sogenannte S15M_{K258A}-Mutante generiert. Für die PCRs wurde folgender Reaktionsansatz verwendet.

Reaktionsansatz der PCR:	250 ng	<i>template</i>
	1 µl	<i>forward</i> -Primer (10 µM)
	1 µl	<i>reverse</i> -Primer (10 µM)
	1µl	dNTPs (10 µM)
	10 µl	5x HiFi Velocity Puffer
	35,5 µl	dH ₂ O
	0,5 µl	<i>Velocity</i> DNA-Polymerase

Die Zyklusparameter waren wie folgt:

Denaturierung	97 °C	5 min
Beginn der 30 Zyklen:		
Denaturierung	97 °C	30 sec
Annealing	55 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec
Synthese nach dem letzten Zyklus	72 °C	10 min
	8 °C	∞

Das PCR-Produkt wurde aus einem 1 % Agarosegel eluiert (vgl. Kapitel IV.1.2) und die aufgereinigten DNA-Fragmente mit den Restriktionsenzymen *Sall*-HF/*PstI*-HF behandelt (vgl. Kapitel IV.1.3) und in den Vektor pCG-leer ligiert (vgl. Kapitel IV.1.4). Mit Hilfe einer *extended-hotshot* Sequenzierung der Firma SeqLab (Göttingen) konnten die Sequenzen des neu konstruierten Vektors überprüft werden. So wurde das in dieser Arbeit verwendete Plasmid pCG-S15-NiV-M_{K258A} hergestellt.

1.8 Hitzeschocktransformation

Die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten kompetenten *Escherichia coli* (E. coli) XL1-blue kann der Doktorarbeit von Dr. Lucie Sauerhering entnommen werden. Für die Transformation wurden kompetente E. coli XL1-Blue auf Eis aufgetaut. Jeweils 1 µg

Plasmid-DNA wurde zu 50 µl Bakterien-Suspension gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C und eine Abkühlung für 5 min auf Eis. 10 µl und 40 µl der Suspension wurde jeweils auf eine Ampicillin - enthaltende (Endkonzentration 0,1 mg/ml) LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

1.9 Präparation von Plasmid-DNA

Bei der Plasmidaufreinigung werden die Bakterienzellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Die Lysate werden dann neutralisiert und durch Filtration von Zellresten und chromosomaler DNA befreit. Anschließend wird das Lysat auf eine Silikamembran gegeben, an die die Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen bindet. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Plasmid-DNA in dH₂O eluiert. Für die Plasmidaufreinigung wurde ausgehend von einer Bakterienkolonie eine Übernachtskultur angeimpft. Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte am nächsten Tag mittels Plasmid DNA Mini Kit I (Omega) oder des Plasmid DNA Maxi Kit (Omega) aus 5 ml oder 100 ml Übernachtskultur. Die Plasmid-DNA wurde nach dem Protokoll des Kit-Herstellers isoliert. Zur quantitativen Messung der aufgereinigten Plasmid-DNA-Menge wurde sie in dH₂O bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) mit einem Photometer (NanoDrop) gemessen.

1.10 RNA-Isolierung

Zur Isolation von RNA aus infizierten Zellen wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Nach dem Aufschluss der Zellmembranen und der Freisetzung der RNA, wird diese bei hoher Salzkonzentration an die Kieselgel-Membran gebunden. Anschließend wird nach mehrmaligen Waschen die RNA in dH₂O eluiert. Zur Quantifizierung viraler RNA-Isolierung wurde die RNA aus dem Überstand infizierter Vero76-Zellen (vgl. Kapitel IV.3.2) zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. isoliert. Hierfür wurden 100 µl des Zellüberstandes mit 350 µl RLT-Puffer mit β-ME (1:100) und 250 µl 100 % Ethanol gemischt. Anschließend konnten die Proben aus dem BSL-4-labor ausgeschleust werden. Die RNA-Isolation wurde dann nach Hersteller-Angaben unter BSL-2-Bedingungen durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 50 µl dH₂O. Zur Bestimmung der Gesamt-RNA

wurde die Menge photometrisch quantifiziert (NanoDrop) und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

1.11 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA muss zunächst in cDNA umgeschrieben werden, damit sie für die quantitative qPCR verwendet werden kann. Hierzu werden das Enzym Reverse und *random hexamer* Primer verwendet, wodurch die gesamte RNA umgeschrieben wird. Für die cDNA-Synthese wurden 10,5 µl der isolierten RNA in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 2 µl *random hexamer* Primer dazu gegeben. Anschließend wurden die Ansätze bei 65°C für 5 min inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen zu zerstören. Als reverse Transkriptase wurde die *Revert Aid RT* der Firma Thermo Fisher verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Hersteller-Angaben.

Reaktionansatz der cDNA-Synthese:

12,5 µl	RNA + <i>random hexamer</i>
4,5 µl	5 x Puffer
2 µl	dNTP Mix (10 mM)
0,5 µl	Ribolock (RNase Inhibitor)
0,5 µl	<i>Revert Aid RT</i>

Die Zyklusparameter waren wie folgt:

25°C	25 min
42°C	60 min
70°C	10 min

Nach der cDNA-Synthese wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

1.12 Quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR)

Prinzipiell funktioniert eine *Real-Time*-PCR wie eine Standard-PCR (vgl. Kapitel IV.1.1). Allerdings erfolgt die Auswertung bei einer *Real-Time*-PCR nicht am Ende der PCR, sondern es erfolgte nach jedem Zyklus. Durch die Zugabe eines autofluoreszierenden Farbstoffes (hier *SYBR Green*), der an doppelsträngige DNA bindet, kann so die neu

amplifizierte DNA nach jedem Zyklus einfach über eine Fluoreszenzmessung detektiert werden. Durch diese Messung wird in Echtzeit die ansteigende Menge an DNA durch die ansteigende Fluoreszenz abzüglich der Hintergrundfluoreszenz gemessen. Dabei ist der Anstieg der Fluoreszenz prinzipiell mit der Menge an vorliegender DNA gleichzusetzen (Woo *et al.* 1998; Morrison *et al.* 1998). Da es nicht möglich ist in diesem System zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten zu unterscheiden, muss nach jeder qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Hierbei wird durch kontinuierliches Erhöhen der Temperatur um 0,3°C von 60°C bis 95°C die DNA aufgeschlossen und das *SYBR Green* freigesetzt, wodurch die Fluoreszenz abnimmt. Dabei korreliert die spezifische Länge des Amplifikats mit der Fluoreszenzabnahme bei einer spezifischen Temperatur für das jeweilige Fragment. Die Menge des gebildeten Fragmentes kann annähernd durch die Höhe des erhaltenen Peaks der Schmelzkurve bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden für alle Proben jeweils Triplikate untersucht. Hierfür wurden pro Reaktionsansatz 1 µl cDNA aus dem Überstand mit NiV-N-spezifischen *forward* und *reverse* Primer (jeweils 100 pmol/l) und 2x QuantiFast *SYBR Green* PCR Master Mix (Thermo Fisher) gemischt und mit dH₂O auf 25 µl aufgefüllt.

Die Zyklusparameter waren wie folgt:

initialer Aktivierungsschritt	95 °C	5 min
Beginn von 40 Zyklen:		
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	53 °C	30 sec
Elongation*	72 °C	1 min

(* hier erfolgt die Messung der Fluoreszenz)

Die Reaktion lief in einem *Real-Time*-PCR-Cycler (Step One, Applied Biosystems) ab. Zur Auswertung der qPCR wurden über die Software des Step One Quantitative PCR Systems die Ct-Werte der einzelnen Proben bestimmt. Dabei beschreibt der Ct-Wert den Zyklus der qPCR bei dem das erste Mal die Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Da die Ausgangsmenge an viraler RNA im Überstand mit der Menge an cDNA korreliert übersteigt die Fluoreszenz umso früher die Hintergrundfluoreszenz je mehr cDNA in den Proben vorhanden ist. Das heißt, je größer die Ausgangsmenge an virale

RNA im Zellüberstand ist, desto kleiner wird der Ct-Wert. Berechnet man 2^{-Ct} erhält man ein relatives Maß für die Viruspartikelmenge (Sauerhering *et al.*, 2016).

2. Zellbiologische Methoden

2.1 Zellkultur permanenter Zelllinien

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl verschiedener Säugerzelllinien verwendet, die der Tabelle III.3 entnommen werden können.

Tabelle III.3: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Zellkulturmedium
Vero76	Nierenepithelzelllinie aus der Grünen Meerkatzen	10 % FCS haltiges DMEM
A549	humane Alveolar-Adenokarzinom-Zelllinie	10 % FCS haltiges DMEM
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie	10 % FCS haltiges DMEM
Huh-7	humane Hepatom-Zelllinie	10 % FCS haltiges DMEM
MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)	Epithelzelllinie aus der Niere eines Cockerspaniel	10 % FCS haltiges MEM

Allen Zellkulturmedien wurde zudem L-Glutamin (Endkonzentration: 4 mM), 100 U ml⁻¹ Penicillin und 100 µg ml⁻¹ Streptomycin zugesetzt. Zum Passagieren der Zellen einer 75 cm²-Zellkulturflasche wurden die Zellen zweimal mit PBS_{def} gewaschen und anschließend in 5 ml 0,05 % Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert, bis sich der Zellrasen vom Flaschenboden abgelöst hat. Die abgelösten Zellen wurden gründlich in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und mit der jeweiligen Verdünnung auf eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche mit 25 ml frischem Nährmedium passagiert. Die Zellen wurden dann bis zur vollständigen Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Lamina Flow (Heraeus) durchgeführt.

2.2 Aussäen von Zellen

Für die experimentellen Durchführungen wurden die Zellen einer 75 cm²-Zellkulturflasche abgelöst und resuspendiert (vgl. Kapitel IV.2.1) und, wie der Tabelle III.4 zu entnehmen ist, ausgesät.

Tabelle III.4: Aussäen der Zellen auf unterschiedliche Kulturgefäße.

Zelllinie	Kulturgefäß	Volumen Zellsuspension	Vorgelegtes Medium
Vero76	6-well-Platten	1:40 bis 1:60	2 ml DMEM / well
	µ-Dish ^{35 mm}	1:100 bis 1:400	1,5 ml DMEM
	24-well-Platten (+DG)	1:200 bis 1:400	500µl DMEM / well
A549	24-well-Platten (+DG)	1:200 bis 1:400	500µl DMEM / well
HeLa	24-well-Platten (+DG)	1:200 bis 1:400	500µl DMEM / well
Huh-7	24-well-Platten (+DG)	1:200 bis 1:400	500µl DMEM / well
MDCK	24-well-Platten (+DG)	1:200 bis 1:400	500µl MEM / well
	µ-Dish ^{35 mm}	1:100 bis 1:400	1,5 ml MEM

Die Zellen wurden dann bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert bis sie etwa 70-80 % konfluent waren.

2.3 Transfektion der Zellen

Um Plasmid-DNA zeitweilig (transient) in den verwendeten Zelllinie zu exprimieren, wurden die Plasmid-DNA mittels Transfektion in die Zellen eingeschleust. Hierfür wurden *Lipofectamine*TM 2000 (LFA 2000; Invitrogen) oder FuGENE HD (Promega) verwendet. Alle hier verwendeten Zelllinien waren prinzipiell mit den beiden Reagenzien transfizierbar, welches verwendet wurde, hing vom Kulturgefäß ab. Wie und mit welcher Menge Plasmid-DNA die Transfektionen durchgeführt wurden, ist der Tabelle III.5 zu entnehmen.

Tabelle III.5: Transfektionsansätze mit LFA 2000 und FuGENE HD.

Kulturgefäß	DNA-Gemisch	Transfektions-Gemisch	Auf die Zellen vorgelegtes Medium
6-well (LFA)	5 µg DNA + 250 µl OptiMEM	7,5 µl LFA 2000 + 250 µl OptiMEM	1,5 ml OptiMEM
24-well (DG)	1 µg DNA + 50 µl OptiMEM	1,5 µl LFA 2000 + 50 µl OptiMEM	400 µl OptiMEM
Ibidi 35µm-dishes (MDCK)	5 µg DNA + 250 µl OptiMEM	7,5 µl LFA 2000 + 250 µl OptiMEM	1 ml OptiMEM
Ibidi 35µm-dishes (Vero)	5 µg DNA + 250 µl OptiMEM	30 µl FuGENE HD + 250 µl OptiMEM	1 ml DMEM (2 % FCS)
6-well (FuGENE HD)	5 µg DNA + 250 µl OptiMEM	40 µl FuGENE HD + 250 µl OptiMEM	1,5 ml OptiMEM

Für LFA 2000 wurde das LFA mit OptiMEM gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde die DNA ebenfalls mit OptiMEM gemischt und anschließend das vorinkubierte LFA 2000 vorsichtig zum DNA-Gemisch gegeben. Durch leichtes Schnippen des Reaktionsgefäßes wurde der Transfektionsansatz gemischt und für weiter 30 min bei RT inkubiert. Für FuGENE HD wurden die DNA und das FuGENE HD in OptiMEM gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Transfektionsansätze tröpfchenweise in das auf die Zellen vorgelegte Medium gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die LFA-Transfektion wurde 4 bis 6 h nach der Transfektion (*post transfection*; p.t.) das Transfektionsmedium gegen Zellkulturmedium (mit 10 % FCS) getauscht und die Zellen weiter inkubiert.

2.4 Austitrieren der Zytoskelett-Inhibitoren-Konzentration in Vero76-Zellen

Um den Einfluss des Zytoskelettes auf den NiV-M- oder NiV-IB-Transport untersuchen zu können, mussten die optimalen Konzentrationen der verwendeten Inhibitoren zunächst in Vero76-Zellen austitriert werden. Als Inhibitoren wurde Cytochalasin D (CytoD; Stocklösung: 4 mM in DMSO) verwendet. Dies inhibiert die Polymerisierung des F-Aktins und damit die dynamische Bildung von Aktinfilamenten. Außerdem wurde Nocodazol (Noco, Stocklösung: 10 mM in DMSO), welches die Polymerisierung der Mikrotubuli verhindert, verwendet. Zum Austitrieren wurden Vero76-Zellen auf Deckgläschen im 24-well ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und am nächsten Tag mit 10 % FCS haltigen DMEM und unterschiedliche Konzentrationen an CytoD (0,5 μ M bis 8 μ M) und Noco (0,25 μ M bis 2 μ M) für 6 h inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit 0,025 % DMSO inkubiert. 6 h nach der Inhibitorzugabe wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert, mit 0,1 % TX-100 permeabilisiert und Aktin und Tubulin, wie in Kapitel IV.4.1.6 beschrieben, gefärbt.

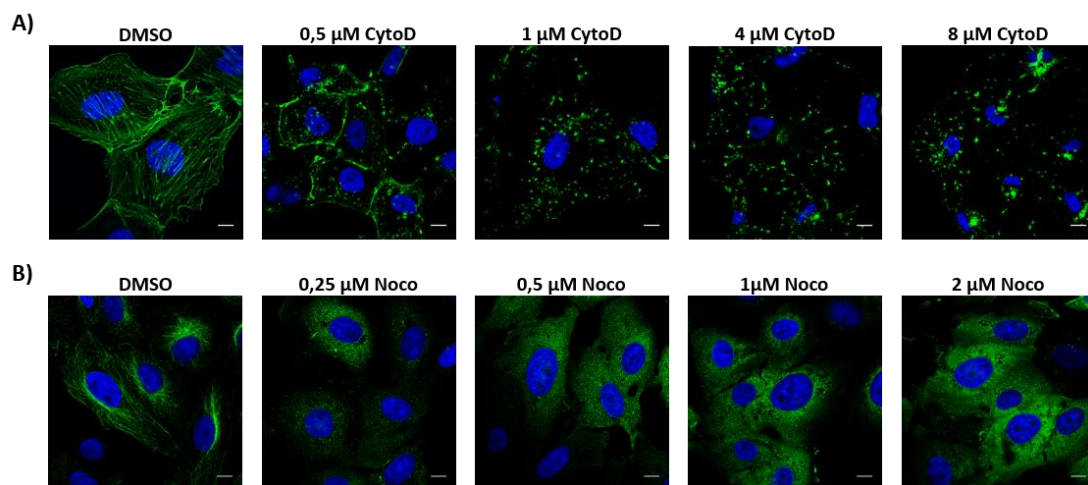


Abbildung IV.2: Austitrieren der optimalen Konzentration von Zytoskelett-Inhibitoren. Vero76-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen für 6 h mit verschiedenen Konzentrationen an Cytochalasin D (A) und Nocodazol (B) behandelt und anschließend mit 4 % PFA fixiert und 0,1 % TritonX-100 permeabilisiert. Das Zytoskelett wurde durch Phalloidin-Atto488 (Aktin) oder durch einen α -Tubulin-spezifischen Antikörper (Mikrotubuli) und einen AF 488-markierten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Proben wurden am konfokalen Laserscanning Mikroskop (Argon-Laser und 405 Diode; Leica TCS SP5 II) mit einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV-Objektiv ausgewertet. Maßstabsbalken: 10 μ M.

Wie in Abbildung IV.2 A zu sehen ist, hat jede der verwendeten CytoD Konzentration einen Einfluss auf das Aktinzytoskelett. Da bei 1 μ M CytoD der Zytokortex und auch die sogenannten *stress fibers* zerstört waren und die Zellen noch nicht apoptotisch

aussahen, wurden alle weiteren Versuche mit dieser Konzentration durchgeführt. Für die Noco-Konzentration war dies bei der Konzentration 0,5 μM gegeben (Abb IV.2 B), weswegen mit dieser Konzentration weiter gearbeitet wurde.

3. Virologische Methoden

Alle durchgeführten Infektionsversuche mit rekombinanten NiV wurden von Anja Heiner, Laura Behner, Dr. Lucie Sauerhering und Dr. Michael Weis im Hochsicherheitslabor (BSL-4-Labor) des Instituts für Virologie in Marburg durchgeführt.

3.1 Herstellung von rekombinanten Nipahviren

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Viren wurden nach dem Protokoll von Dietzel *et al.* (2015) hergestellt. Die hier verwendeten Volle-Länge-Plasmide und die daraus generierten rekombinanten Viren sind in Tabelle III.6 aufgeführt.

Tabelle III.6: Auslistung der verwendeten rekombinanten Viren.

Vollelänge-Plasmid	Rekombinantes Virus
pBR/T7-NiVeGFP	rNiVwt
pBR/T7-VL NiV eGFP Δ M	rNiV Δ M
pBR/T7-VL NiV M NES	rNiV-M _{NESmut}

Um die Anzahl der infektiösen Viren, d.h. die Virustiter zu ermitteln wurde die Methode der TCID₅₀ (*tissue culture infective dosis*)- Bestimmung verwendet (siehe Doktorarbeit von Dr. Lucie Sauerhering, 2014).

3.2 Infektion von Vero76-Zellen

Um den Einfluss der Kernexport-Mutante NiV-M_{NESmut} auf die Verteilung der NiV-IB in infizierten Zellen und das Assembly untersuchen zu können, wurden Vero76-Zellen auf 24-wells (DG) oder 6-wells ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und im BSL-4-Labor mit rNiVwt, rNiV Δ M oder rNiV-M_{NESmut} mit einer *multiplicity of infection* (MOI; Viruspartikel/Zelle) von 0,005 bis 0,025 für 1-2 h bei 37 °C infiziert. Anschließend wurde das Inokulum abgenommen und die infizierten Zellen wurden mit 2 % FCS haltigem DMEM weiter

inkubiert. Für die Immunfluoreszenzanalysen (vgl. Kapitel IV.4.1.2) wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion (*post infection*; p.i.) für 24 Stunden mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und inaktiviert. Bevor die Zellen aus dem BSL-4-Labor ausgeschleust werden konnten, wurde das PFA gewechselt. Nach dem Ausschleusen mussten die infizierten Proben nochmal über Nacht in PFA inkubiert werden. Zur Titerbestimmung mittels TCID₅₀ und für die RNA-Isolation (vgl. Kapitel IV.1.10) wurde 24 h p.i., 48 h p.i. und 72 h p.i. die Überstände abgenommen.

4. Proteinbiochemische und immunologische Methoden

4.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Mit der indirekten Immunfluoreszenzanalyse (IFA) können Proteine auf der Zelloberfläche oder nach erfolgreicher Permeabilisierung der Zellen auch im Zellinneren nachgewiesen werden. Hierzu werden spezifische Primärantikörper verwendet, die spezifisch an das zu untersuchende Protein binden. Die Primärantikörper werden dann mit einem Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper, der spezifisch gegen den F_C-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist, markiert. Anschließend kann das markierte Protein mit Licht der entsprechenden Wellenlänge und geeigneten Emissionsfilter am Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

Für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA) wurden Zellen auf DG in 24-wells ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit unterschiedlichen Plasmiden transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). 24 h p.t. wurden die Zellen dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit 4 % PFA fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen nach erneutem dreimaligem Waschen für 15 min mit 0,1 % Triton X-100 (in PBS_{def}) inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS⁺⁺ erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers in 0,35 % BSA/PBS⁺⁺ in einer feuchten Kammer. Hierfür wurden 20 µl der Antikörperlösung auf einen Parafilm in der feuchten Kammer pipettiert und das DG mit der Zellseite luftblasenfrei darauf gelegt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 4 °C. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper, wurde das DG wieder in die 24-well-Vertiefung überführt und erneut dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde dieser 1:300 in 0,35 % BSA/PBS⁺⁺ verdünnt. Um die Zellkerne anzufärben wurde zu der Sekundärantikörperlösung zusätzlich eine 1:100 Vorverdünnung des Farbstoffes DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; Verdünnung 1:100

in 0,35 % BSA/PBS⁺⁺) hinzugegeben. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde wieder in der feuchten Kammer für 1 h bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS⁺⁺ gewaschen, das DG einmal in H₂O gewaschen, in Mowiol eingedeckelt und über Nacht zum Trocknen bei 4 °C gelagert. Die Auswertung der IFA erfolgte an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (HeNe 633; Argon-Laser, DPSS 561 und 405 Diode; Leica TCS SP5 II) mit einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV-Objektiv.

4.1.1 Einzel- und Koexpression von NiV-Proteinen in transient transfizierten Zellen

Um die Lokalisation des NiV-Ms und den NiV-M-Mutanten in den unterschiedlichen Zelllinien und die Verteilung von NiV-N und NiV-P in Vero76-Zellen untersuchen zu können, wurden die Zellen auf 24-wells (DG) ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und anschließend mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). Die Färbung wurde, wie unter Kapitel IV.4.1 beschrieben durchgeführt. Die zur Färbung verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen in PBS⁺⁺ mit 0,35 % BSA sind in Tabelle III.7 aufgeführt.

Tabelle III.7: Antikörper zur Färbung von NiV Proteinen in der Einzeldexpression.

Nachgewiesenes Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
NiV-M/NiV-M _{mut}	IG1321 aus Kaninchen (1:250)	anti-Kaninchen-IgG/ AF 568 (1:300)
NiV-N	GP3 aus Meerschweinchen (1:500)	anti-Meerschweinchen-IgG/ AF 488 (1:300)
NiV-P		
NiV-P _{eGFP}	eGFP-Autofluoreszenz	

4.1.2 Immunfluoreszenzanalyse von NiV-M und NiV-IB in infizierten Zellen

Um den Einfluss des NiV-Ms auf die Verteilung der IB in infizierten Zellen zu untersuchen, wurden Vero76-Zellen auf 24-wells (DG) ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit rNiVwt, rNiVΔM und rNiV-M_{NESmut} infiziert (vgl. Kapitel IV.3.2). Die Proben wurden nach den jeweiligen Zeitpunkten im BSL-4-Labor 15 min mit 4 % PFA fixiert. Zum Ausschleusen wurden die Proben 48 h mit 4 % PFA inaktiviert. Unter BSL-2-Bedingungen wurden die DG mit PBS⁺⁺ gewaschen und bei RT für 1 h in 10 % FCS haltigem DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 0,1 M Glycin in PBS⁺⁺ für 15 min bei RT inkubiert, bevor, wie unter Kapitel IV.4.1 beschrieben, die Antikörperfärbung durchgeführt wurde. Die verwendeten Antikörper können der Tabelle III.8 entnommen werden.

Tabelle III.8: Antikörper zur Färbung von NiV-M, -N und -P in infizierten Vero76-Zellen.

Nachgewiesenes Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
NiV-M/NiV-M _{mut}	IG1321 aus Kaninchen (1:250)	anti-Kaninchen-IgG/ AF 568 (1:300)
NiV-N	GP3 aus Meerschweinchen (1:500)	anti-Meerschweinchen-IgG/ AF 488 (1:300)
NiV-P		

Nach der Antikörperfärbung wurden die BSL-4-Proben nach fünf Tage vernichtet. Die Auswertung der infizierten Proben erfolgte ebenfalls am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP5 II). Zur Auswertung der infizierten Zellen wurden hauptsächlich Stapelaufnahmen (*z-stacks*) verwendet, die in dieser Arbeit als Maximal-Projektionen dargestellt werden. Der Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmen einer Stapelaufnahme beträgt 200 nm.

4.1.3 Kolokalisationsstudien von NiV-IB mit zellulären Kompartimentmarkern

Zur Untersuchung, ob die perinukleären NiV-IB in einem bekannten zellulären Kompartiment akkumulieren oder ein eigenes Kompartiment bilden, wurden Vero76-Zellen auf 24-wells (DG) ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit NiV-N und NiV-P oder NiV-P_{eGFP} exprimierenden Plasmide transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). Die NiV-IB wurden wie vorher beschrieben, entweder über die Antikörperfärbung mit dem GP3-Serum oder über den C-terminalen eGFP-tag im P-Protein (P_{eGFP}) detektiert. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen zur Färbung der zellulären Kompartiment wurden, wie der Tabelle III.9 zu entnehmen ist, eingesetzt.

Tabelle III.9: Verwendete Antikörper zur Färbung von zellulären Kompartimenten.

Zelluläres Kompartiment	Nachgewiesene Proteine	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Frühes Endosom	EEA1	α -EEA1 (1:50) aus Maus	anti-Maus-IgG/ AF 568 (1:300)
Spätes Endosom	Lamp1	α -Lamp1 (1:50) aus Maus	anti-Maus-IgG/ AF 568 (1:300)
Golgi	GM130	α -GM130 (1:30) aus Maus	anti-Maus-IgG/ AF 568 (1:300)
Endoplasmatisches Reticulum (ER)	Calnexin	α -Calnexin (1:100) aus Maus	anti-Maus-IgG/ AF 568 (1:300)
<i>stress granules</i>	G3BP1	α -G3BP1 (1:200) aus Maus	anti-Maus-IgG/ AF 568 (1:300)
Peroxisom	PMP70	α -PMP70 (1:500) aus Kaninchen	anti-Kaninchen-IgG/ AF 568 (1:300)

4.1.4 Kokokalisationsstudien von NiV-IB und anderen viralen Matrixproteinen

Um den Einfluss von anderen viralen Matrixproteinen auf die Lokalisation der NiV-IB zu untersuchen, wurden Vero76-Zellen auf 24-wells (DG) ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit Plasmiden, welche das jeweilige virale Matrixprotein kodieren, transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). Der Nachweis der NiV-IB erfolgte über den C-terminalen eGFP-tag am NiV-P_{eGFP}. Die zur Färbung der Matrixproteine verwendeten Antikörper sind in Tabelle III.10 aufgelistet.

Tabelle III.10: Verwendete Antikörper zur Färbung viraler Matrixproteine.

Nachgewiesenes Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
HeV-M	α -HeV Serum (1:100) aus Kaninchen	anti-Kaninchen-IgG/ AF 568 (1:300)
MV-M	MAB8910 (1:100) aus Maus	anti-Maus-IgG/ AF 568 (1:300)
NDV-M	α -NDV Serum (1:500) aus Kaninchen	anti-Kaninchen-IgG/ AF 568 (1:300)
RABV-M_{flag}	α -flag (1:100) aus Kaninchen	anti-Kaninchen-IgG/ AF 568 (1:300)
EBOV-VP40	α - EBOV-VP40 (1:100) aus Maus	anti-Maus-IgG/ AF 568 (1:300)
LASV-Z_{HA}	α -HA (1:100) aus Kaninchen	anti-Kaninchen-IgG/ AF 568 (1:300)

4.1.5 Koimmunfluoreszenz-Analyse von NiV-M, NiV-IB und Zytoskelett-Markern in transient transfizierten Zellen

Um den Einfluss des Zytoskelettes auf den NiV-M-Transport näher zu prüfen, wurden Vero76-Zellen auf 24-wells (DG) ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). 2 h p.t. wurden die Inhibitoren in den ausgetesteten Konzentrationen (vgl. Kapitel IV.2.4) zu dem Transfektionsgemisch gegeben. Der Mediumwechsel wurde 4 h p.t. mit Zellkulturmedium und den entsprechenden Konzentrationen an den Inhibitoren

durchgeführt und die Zellen weiter bei 37 °C inkubiert. 10 h p.t wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und die Antikörperfärbung durchgeführt (vgl. Kapitel IV.4.1). Die NiV-IB wurden über den C-terminalen eGFP-tag am NiV-P_{eGFP} detektiert. Die zur Färbung verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen in PBS⁺⁺ mit 0,35 % BSA sind in Tabelle III.11 aufgeführt.

Tabelle III.11: Verwendete Antikörper zur Färbung von NiV M und Zytoskelett-Markern in transfizierten Vero76-Zellen.

Transfektion	Nachgewiesenes Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
NiV-M / NiV-M_{mut} + CytoD	NiV-M	IG1321 (1:250) aus Kaninchen	anti-Kaninchen-IgG/ AF 568 (1:300)
	F-Actin	Phalloidin-Atto488 (1:50)	
NiV-M + Noco	NiV-M	IG1321 (1:250) aus Kaninchen	anti-Kaninchen-IgG/ AF 568 (1:300)
	Tubulin	α-tubulin (1:1000) aus Maus	anti-Maus-IgG/ AF 488 (1:300)
NiV-N/-P_{eGFP} + CytoD	F-Actin	Phalloidin-TRITC (1:500)	
NiV-N/-P_{eGFP} + Noco	Tubulin	α-tubulin (1:1000) aus Maus	anti-Maus-IgG/ AF 568 (1:300)
NiV-M + NiV-N/-P_{eGFP} + CytoD	NiV-M	IG1321 (1:250) aus Kaninchen	anti-Kaninchen-IgG/ AF 647 (1:300)
	F-Actin	Phalloidin-TRITC (1:500)	
NiV-M + NiV-N/-P_{eGFP} + Noco	NiV-M	IG1321 (1:250) aus Kaninchen	anti-Kaninchen-IgG/ AF 647 (1:300)
	Tubulin	α-tubulin (1:1000) aus Maus	anti-Maus-IgG/ AF 568 (1:300)

4.1.6 „Nukleokapsid-Lokalisations-Makro“ (NukLoM) zur Quantifizierung der Lokalisation von NiV-IB

In Anlehnung an die Quantifizierung von Yacovone *et al.* (2016) sollte eine Methode zur Quantifizierung der Verteilung der NiV-IB-Fluoreszenz vom perinukleären Bereich zur Zellperipherie entwickelt werden. Basierend auf der Software ImageJ (v.1.51) wurde zu diesem Zweck ein Makro in Zusammenarbeit mit Sandro Halwe entwickelt, welches den Namen „Nukleokapsid-Lokalisations-Makro“ (NukLoM) trägt. Dieses Makro quantifiziert die Verteilung der NiV-IB anhand der Fluoreszenz-Intensität entlang der Strecke von Zellkern zur Plasmamembran. Dafür wurden für jede analysierte Zelle (Abb. IV.3 A1) zwei *regions of interest* (ROI) festgelegt. Die erste ROI wird durch die DAPI-Färbung definiert und zeigt die Grenze des Zellkerns an (Abb. IV.3 A2). Die zweite ROI stellt die Zellgrenzen selbst da (Abb. IV.3 A3). Das Makro bietet hier die Möglichkeit für jede Analyse die Fluoreszenzkanäle, welche die ROIs festsetzen, individuell zu ändern. Die Festsetzung der ROIs erfolgte dann automatisch durch ImageJ anhand des ausgewählten Fluoreszenzkanals. Zudem kann eine fehlerhafte Definition der ROIs manuell im Programm angepasst und geändert werden. Nach der endgültigen Festlegung der ROIs („Zellmasken“) werden auf dem kürzesten Weg vom Zellkern zur Zellgrenze Linien durch das Zytoplasma gezogen (zwischen 500 und 900), wobei Linien die mehr als zwei Grenzen überschreiten aus der Quantifizierung ausgeschlossen werden. Jede Linie wird anschließend in 20 gleichgroße Abschnitte geteilt, wobei jeder Teilabschnitt 5 % der Gesamtlänge der Linie repräsentiert. Die ersten zehn Teilabschnitte (0 - 50 %) werden als perinukleäre Region und die letzten zehn Teile (50 - 100 %) werden als periphere Region definiert. Für jeden der 20 Teilabschnitte (5 % Bereiche) einer Linie wird die mittlere Fluoreszenzintensität berechnet. Hierbei werden Linien bei denen die Fluoreszenzintensität in keinem der Teilabschnitte einen Schwellwert von 15 übersteigt aus der Analyse herausgenommen. So ist gewährleistet, dass mindestens ein IB auf der in die Analyse mit einbezogenen Linie liegt (Abb. IV.3 B). Die Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität werden dann für alle Linien und alle Teilabschnitte (5 % Bereiche) einer Zelle gemittelt. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in den 20 Teilabschnitten wird schließlich in Abhängigkeit der Lage (relativer Abstand von Zellkern

und Plasmamembran) graphisch dargestellt. Beispiele für Graphen, die eine perinukleäre bzw. periphere IB-Lokalisation belegen, sind in Abbildung IV.3 C gezeigt.

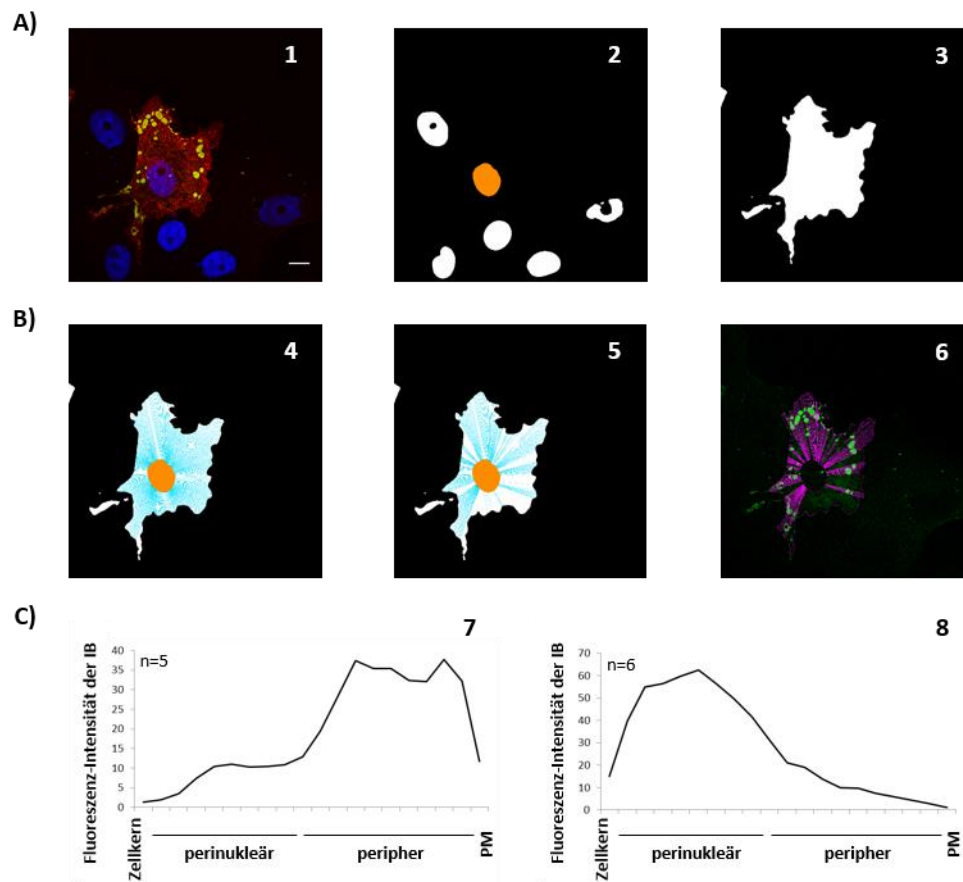


Abbildung IV.3: Einzelschritte bei der Verwendung des ImageJ-Makros NukLoM. (A) Ausgehend von einer Fluoreszenz-Aufnahme (1) wurden mit Hilfe des Makros die beiden ROI für den Zellkern (2) und die gesamte Zelle und damit die Zellgrenzen/Plasmamembran (3) festgesetzt. (B) Nach Bestätigung der ROIs ("Zellmasken") werden Linien vom Zellkern zur Plasmamembran durch das Zytoplasma gezogen (4). Linien bei denen die Fluoreszenzintensität den Schwellenwert von 15 in keinem 5 % Bereich überschritten wird, werden aus der Analyse genommen (5). So werden ausschließlich Linien quantifiziert, die mindestens ein IB passieren (6). (C) Graphische Darstellung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Lokalisation der IB (relativer Abstand zum Zellkern und der Plasmamembran (PM)). Gezeigt sind Beispiele für Graphen bei einer peripheren IB- (7) und einer perinukleären IB-Verteilung (8). IB: *inclusion bodies*; PM: Plasmamembran.

4.2 Live cell imaging des NiV-Ms in MDCK-Zellen

Um Proteine *in vivo* untersuchen zu können, müssen sie mit fluoreszierenden Proteinen wie eGFP (Chiu *et al.*, 1996; Cormack *et al.*, 1996) oder mCherry (Shaner *et al.*, 2004) markiert sein. Dies ermöglicht es, diese Proteine ohne die Verwendung von Antikörpern in unfixierten Zellen nachzuweisen. Die Methode des *live cell imaging* ist daher für die Untersuchung der Transportwege von Proteinen unumgänglich. Zur Untersuchung des

Kerntransits des NiV-Ms in MDCK-Zellen, wurden diese auf ein μ -Dish^{35 mm} (vgl. Kapitel IV.2.2) ausgesät und mit LFA 2000 und dem pCG-mCherry-linker-NiV-M_{Kozak} transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). Bevor die Zellen am *live cell imaging*-Mikroskop (Nikon TE 2000) dokumentiert wurden, wurde ein Mediumwechsel mit dem CO₂-unabhängigen Leibovitz's Medium mit 10 % FCS und 1 mM Trolox (6-hydroxy- 2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), eine Vitamin B6-Derivat, welches dem oxidativen Stress entgegenwirkt, durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einem Plan APO 60x Oil und einem Texas Red HYQ-Filter (Ex. 532-587 nm und Em. 608-683 nm) in einem Intervall von 30 sec aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Nikon NIS-Elements Software.

4.3 Etablierung des *live cell imaging* in kotransfizierten Vero76-Zellen

Zur Untersuchung des NiV-Ms und NiV-IB Transportes wurden in dieser Arbeit ein mCherryNiV-M (Doktorarbeit Boris Lamp, 2013) und ein NiV-P_{eGFP} (Masterarbeit Pauline Schepsky, 2016) verwendet. Vor den Untersuchungen im *live cell imaging* wurde überprüft, ob die getaggten Proteine sich wie die wildtypischen Proteine verhalten. Hierzu wurden Vero76-Zellen auf 24-wells (DG) ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit den aus der Tabelle III.12 zu entnehmenden Plasmid-Kombinationen transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3).

Wir konnten, wie Omi-Furutani *et al.* (2010), in der Koexpression der getaggten NiV-N und NiV-P Proteine eine deutliche IB-Bildung beobachten (Abb. IV.4 A). Die Fluoreszenz-tags am NiV-N oder NiV-P haben somit keinen Einfluss auf die funktionelle Interaktion der beiden Nukleokapsidproteine und damit auf die IB-Bildung. Für weitere Versuche wurde immer nur das eGFP-markierte P-Protein exprimiert, um die IB zu visualisieren. Im Gegensatz zu den getaggten N- und P-Proteinen war das mCherryNiV-M nicht mehr funktionell, denn es konnte nicht mehr mit den IB interagieren bzw. kolokalisieren (Abb. IV.4 B). Der mCherry-tag beeinflusst anscheinend die Interaktion des NiV-Ms mit den NiV-IB. Dies konnte auch schon für das MARV-VP40 gezeigt werden, wo ebenfalls ein N-terminaler mCherry-tag am VP40 die Interaktion mit dem Nukleoprotein verhindert (Schudt *et al.*, 2013). Sowohl die Interaktion/Kolokalisation als auch die Bildung von IB an der Plasmamembran konnte wieder hergestellt werden, wenn das mCherryNiV-M in Kombination mit dem ungetagtem NiV-M exprimiert wurde, wobei ein

Plasmidverhältnis von 1:5 gut geeignet war (Abb. IV.4 C). Hier zeigte sich die gleiche periphere IB-Fluoreszenz wie bei der Expression mit ausschließlich ungetagtem NiV-M (Abb. IV.4 D).

Tabelle III.12: Plasmid-Kombinationen zur Untersuchung der getagten NiV Proteine.

Transfektion	Plasmidmenge (1 µg)
NiV-N_{mCherry}	0,5 µg
NiV-P_{eGFP}	0,5 µg
mCherryNiV-M	0,33 µg
NiV-N	0,33 µg
NiV-P_{eGFP}	0,33 µg
mCherryNiV-M	0,066 µg
NiV-M	0,264 µg
NiV-N	0,33 µg
NiV-P_{eGFP}	0,33 µg
NiV-M	0,33 µg
NiV-N	0,33 µg
NiV-P_{eGFP}	0,33 µg

Für das *live cell imaging* wurden Vero76-Zellen auf µ-Dish^{35 mm} (vgl. Kapitel IV.2.2) ausgesät und mit FuGENE HD und den entsprechenden Plasmiden transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3 und Tabelle 13). Bevor die Zellen am *live cell imaging*-Mikroskop (Nikon TE 2000) untersucht wurden, wurde ein Mediumwechsel mit dem CO₂-unabhängigen Leibovitz's Medium (Gibco) mit 10 % FCS und 1 mM Trolox (6-hydroxy- 2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; Sigma) durchgeführt. Für gute Wachstumsbedingungen wurde die Umgebung der Zellen auf 37 °C erwärmt. Die Aufnahmen wurden mit einem Plan APO 60x Oil, einem Texas Red HYQ-Filter (Ex. 532-587 nm und Em. 608-683 nm) und einem GFPHQ-Filter (Ex. 455-485 nm und Em. 500-545 nm) in einem Intervall von 30-50 sec aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Nikon NIS-Elements Software.

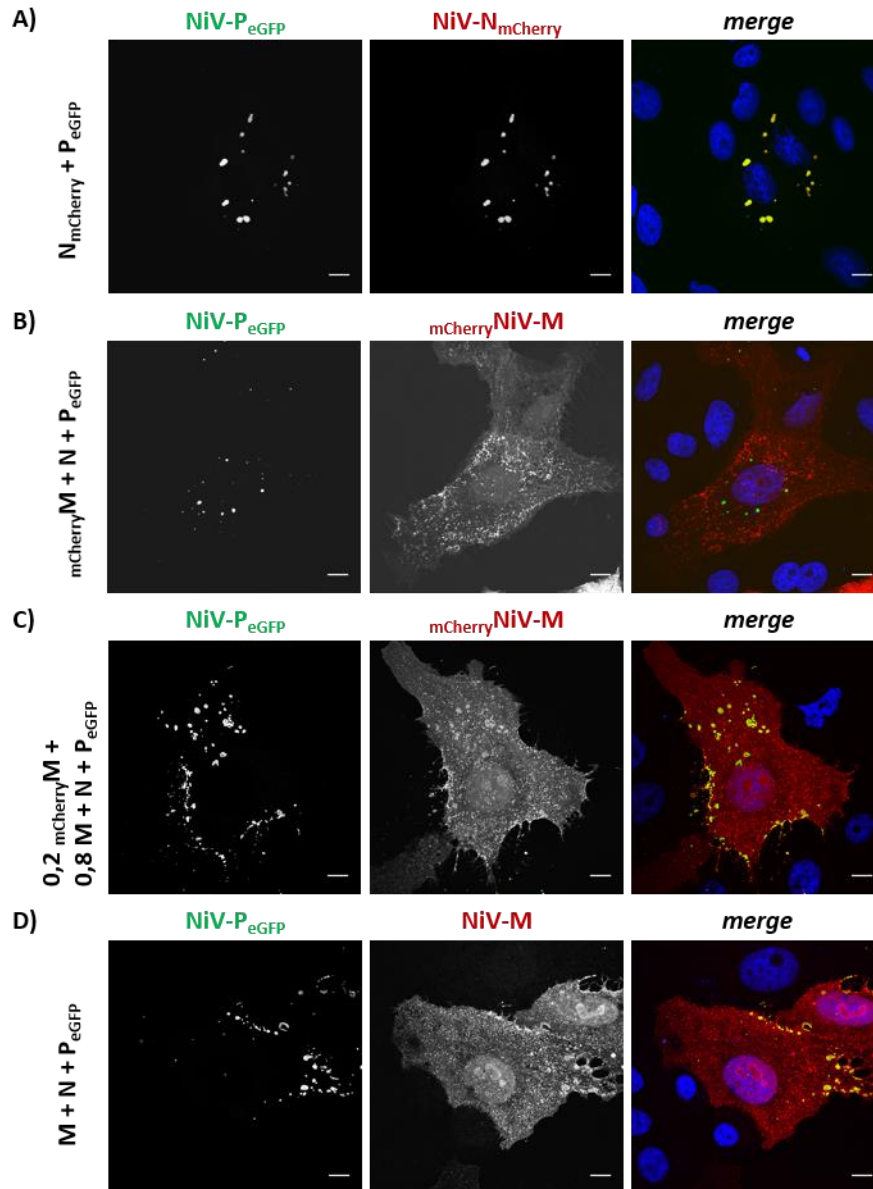


Abbildung IV.4: Verteilung von eGFP- und mCherry-getaggtten NiV-Proteinen. Vero76-Zellen wurden auf DG ausgesät und mit den in der Abbildung links angegebenen Plasmiden und LFA 2000 transfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und die NiV-Proteine über die Autofluoreszenz des eGFP- oder mCherry-tags detektiert (A, B, C). (D) Das M wurde mit einem Peptid-spezifischen Antikörper (IG1321, 1:250) und einem AF 568-markierten α -Kaninchen-IgG Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt (blau). Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Argon-Laser, DPSS 561 und 405 Diode; Leica TCS SP5 II) und einem HCX PL APO CS 63.0x1.40 Oil UV ausgewertet. Maßstabsbalken: 10 μ M.

4.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie transfizierter Vero76-Zellen

Die Elektronenmikroskopie (EM) von zellulären Ultradünnschicht-Schnitten erlaubt einen Einblick in die subzellulären Strukturen von infizierten oder in diesem Fall transfizierter Zellen. Um die Strukturen von peripheren und perinukleären IB vergleichen und analysieren zu können, wurden Vero76-Zellen auf 6-wells ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit den entsprechenden Plasmiden, die für NiV-N, NiV-P_{eGFP} und NiV-M kodieren, transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3). 24 h p.t. wurden die Zellen durch die Zugabe des gleichen Volumens einer 2-fach konzentrierten Fixierungs-Lösung [120 mM piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure), 50 mM HEPES, 4 mM MgCl₂, 20 mM EGTA, 8 % Paraformaldehyd, 0.2 % Glutaraldehyd, pH 6.9] zum Kulturmedium für 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen abgekratzt und bei 4 °C und 13.000 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 4 % PFA in DMEM überschichtet. Die folgenden Schritte einschließlich Postfixierung mit Osmiumtetroxid, Dehydratation, und Einbettung in Epon und Araldite, Präparation der Ultradünnschicht-Schnitte und die EM-Analyse wurden von Dr. Larissa Kolesnikova durchgeführt (Bharat *et al.*, 2011; Köhler *et al.*, 2015). Die eingebetteten Proben wurden mittels eines Leica Ultracut UCT Mikrotomes (Leica EM UC6) in 60 bis 90 nm dünne Scheiben geschnitten und mit Uranylacetat und Bleizitrat gefärbt. Die Ultradünnschicht-Schnitte wurden anschließend mit einem JEM 1400 Transmissions-Elektronenmikroskop analysiert.

4.5 Zellyse zur Untersuchung der Oligomerisierung der NiV-M-Mutanten

Um die Oligomerisierung des NiV-Ms und der NiV-M-Mutanten untersuchen zu können, wurden Vero76-Zellen auf 6-wells ausgesät (vgl. Kapitel IV.2.2) und mit Plasmiden transfiziert (vgl. Kapitel IV.2.3), die wildtypisches oder mutiertes NiV-M kodieren. 24 h p.t. wurden die Zellen in 500 µl Triton-Lysis-Puffer (mit Protease-Inhibitor-Cocktail, Verdünnung 1:100) für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellen im Puffer abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden dann bei 13000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Jeweils 20 µl des Lysats wurden mit Probenpuffer (PP) gemischt (2-fach konzentriert). Dabei wurde dem PP für die Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen vor der Mischung mit den Lysaten 4 % β-Mercaptoethanol zugesetzt. Die mit PP versetzten

Lysate wurden bei 96°C für 5-10 min aufgeköcht und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen (vgl. Kapitel IV.4.5).

4.6 SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS in einem 10 %-ige Polayacryamid-Gele wurde durchgeführt, wie in der Doktorarbeit von Dr. Boris Lamp (2013) beschrieben. Anhand des mitgeführten Größenstandards (Marker) *prestained protein marker, broad range* (NEB) wurde die Elektrophorese verfolgt und nach ausreichender Auftrennung gestoppt.

Die in der SDS-PAGE (vgl. Kapitel IV.4.5) aufgetrennten Proteine, wurden für den Western Blot über ein Elektroblothing-Verfahren mit Hilfe eines Transferpuffer und Whatman-Filterpapier auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dieses Blotverfahren ist ebenfalls ausführlich in der Doktorarbeit von Dr. Boris Lamp (2013) beschrieben. Nach dem Blotting wurden die Nitrozellulose-Membran für 1 h bei RT mit 5 % iger Magermilchpulverlösung (in PBS_{def}/0,1 % Tween) abgesättigt, um unspezifische Bindungen an die Nitrozellulose zu verhindern. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit 0,1 % TWEEN/PBS_{def} gewaschen, bevor sie zum Nachweis des NiV-Ms mit dem Peptidserum aus dem Kaninchen IG1321 (1:1000 in 0,1 % TWEEN/PBS_{def}) über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 min mit 0,1 % TWEEN/PBS_{def} gewaschen und dann mit einem biotinylierten anti-Kaninchen-IgG Antikörper (1:2000 in 0,1 % TWEEN/PBS_{def}) für 1 h inkubiert. Nach weiteren Waschsritten wurde die Membran mit Streptavidin-HRP (*horsereadish peroxidase*) (1:1000 in 0,1 % TWEEN/PBS_{def}) für 1 h inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal mit 0,1 % TWEEN/PBS_{def} und einmal mit PBS_{def} gewaschen. Um die gebundene Peroxidase nachzuweisen, wurde die Membran 2 min in 1 ml Super *Signal West Dura Extended Duration Substrate* inkubiert. Die Belichtung und Entwicklung der Membran erfolgte direkt im Anschluss am Chemidoc XRS+ (Biorad).

V. Material

1. Materialien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	Riedel-de Haen, Seelze
Acrylamid (Rotiphoese Gel 30% Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	BD Bioscience, Heidelberg
Borsäure	Fisher Scientific, Schwerte
Bovines Serumalbumin (BSA)	MP Biomedicals, Eschwege
Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, Steinheim
DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]octan)	Merck, Darmstadt
DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA Ladder Mix (DNA Langenstandard)	Thermo Fisher, Dreieich
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Ethlyendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fötales Kalberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega, Madison, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Riedel-de Haen, Seelze
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kalimuhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kulturgefäße/-schalen	Greiner, Frickenhausen
L-Cystein	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
<i>Lipofectamine</i> TM 2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergunzburg
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mowiol 4-88	Calbiochem, San Diego, USA
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natrimhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt

Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Phalloidin-TRITC	Sigma- Aldrich, Steinheim
Phalloidin-Atto488	Sigma-Aldrich, Steinheim
Prestained Protein Marker (broad range)	NEB, Frankfurt a.M.
Proteaseinhibitor-Mix (PI) SetI	Calbiochem, USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sucrose	Serva, Heidelberg
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher, Dreieich
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trolox	Sigma-Aldrich, Steinheim
TWEEN 20	Serva, Heidelberg
Whatman- Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
μ-Dish ^{35 mm, high} Glass Bottom	Ibidi, Martinsried

2. Antikörper

Primärantikörper:

IG1321; anti-NiV M Peptidserum
aufgereinigt; Konz.: 156 µg / ml

Peptidsequenz:

KIKYKPIMSGNEDIEPEVKDLY

GP3; anti-NiV-Serum

MAB8910; mAK anti-MV M
anti-HeV-M Serum

mAK anti-EBOV VP40

mAK anti-Flag (F7425)

mAK anti-HA (H9658)

anti-α-Tubulin (T9026)

anti-EEA1 (610456)

anti-Lamp1 (611042)

anti-GM130 (610822)

anti-G3BP1 (611127)

anti-Calnexin (ab 31290)

anti-PMP70 (ab3421)

Spezies

Kaninchen

Meerschweinchen

Maus

Kaninchen

Maus

Kaninchen

Kaninchen

Maus

Maus

Maus

Maus

Maus

Maus

Kaninchen

ImmunoGlobe,
Himmelstadt

Prof. H. Feldmann,
Hamilton, MT, USA

Chemicon, Temecula, USA

Prof. Dr. Stefan Finke,
Riems, Deutschland

Prof. Dr. Stephan Becker,
Marburg, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma-Aldrich, Steinheim

BD Biosciences, Heidelberg

BD Biosciences, Heidelberg

BD Biosciences, Heidelberg

BD Biosciences, Heidelberg

Abcam, Cambridge,
Vereinigtes Königreich

Abcam, Cambridge,
Vereinigtes Königreich

Sekundärantikörper:

anti-Meerschweinchen IgG/ AF 488

anti-Kaninchen IgG/ AF 568

anti-Maus IgG/ AF 568

Spezies

Ziege

Esel

Ziege

Lifetechnologies, Darmstadt

Lifetechnologies, Darmstadt

Lifetechnologies, Darmstadt

anti-Ziege IgG/ AF 568	Esel	Lifetechnologies, Darmstadt
anti-Kaninchen IgG/ AF 647	Ziege	Lifetechnologies, Darmstadt

3. Enzyme

dNTPs	Thermo Fisher, Dreieich
RNase Inhibitor (Ribolock)	Thermo Fisher, Dreieich
Reverse Transkriptase (<i>Revert Aid RT</i>)	Thermo Fisher, Dreieich
SAP (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)	Thermo Fisher, Dreieich
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher, Dreieich
Streptavidin-Peroxidase	GE Healthcare, München
0,05 % Trypsin/EDTA	Lifetechnologies, Darmstadt
<i>Velocity</i> DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde

Restriktionsendonukleasen:

<i>Bam</i> HI (5'-G [^] GATCC-3')	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Not</i> I-HF (5'-GC [^] GGCCGC-3')	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Nhe</i> I (5'-G [^] CTAGC-3')	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Pac</i> I (5'-TTAAT [^] TAA-3')	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Pst</i> I-HF (5'-CTGCA [^] G-3')	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Sal</i> I-HF (5'-G [^] TCGAC-3')	NEB, Frankfurt a.M.
Die entsprechenden Puffer wurden von den jeweiligen Firmen bezogen.	

4. Kits

RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
<i>SYBR Green</i> qPCR Kit	Thermo Fisher, Dreieich
DNA Probe Purification Kit	Omega bio-tek, USA
Gel Extraction Kit	Omega bio-tek, USA
Plasmid DNA Mini Kit I Omega	Omega bio-tek, USA
Plasmid DNA Maxi Kit Omega	Omega bio-tek, USA
Q5 [®] <i>Site-Directed Mutagenesis</i> Kit	NEB, Frankfurt a.M.

Die Komponenten der Kits und die Zusammensetzung der jeweils enthaltenen Lösungen kann den entsprechenden Firmenprotokollen entnommen werden.

5. Medien

4 % Paraformaldehyd (PFA)
4 g PFA werden in 100 ml DMEM (ohne Zusätze) unter ständigem Rühren bei 80 °C gelöst und anschließend mit einem Sterilfilter (0,45 µm) filtriert. Lagerung bei -20 °C.

Mowiol (wird zum Eindeckeln von Immunfluoreszenz- Präparaten verwendet)

2,4 g	Mowiol 4-88
6 g	Glyzerin
6 ml	dH ₂ O (über Nacht quellen lassen)
2 ml	0,2 M Tris, pH 8,5

Ansatz unter ständigem Rühren bei 50-60 °C lösen, anschließend für 15 min bei 4000 rpm zentrifugieren, den Überstand mit DABCO (10 % w/v) versetzen und aliquotieren. Lagerung bei -20 °C.

5.1 Wachstumsmedien für eukaryotische Zellen

DMEM (<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>)	Gibco BRL, Eggenstein
Leibovitz's	Gibco BRL, Eggenstein
MEM (<i>Minimum essential medium</i>)	Gibco BRL, Eggenstein
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein

5.2 Wachstumsmedien für prokaryotische Zellen

LB-Medium	10 g NaCl
	5 g Hefeextrakt
	10 g Pepton aus Casein
	ad 1 l mit dH ₂ O
LB-Agar	3,75 g Bakto-Agar
	ad 250 ml LB-Medium

6. Plasmide

pCG-leer	AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pMCS5	AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pTM1-NiV-N	Prof. Dr. Markus Czub, Universität Calgary, Kanada
pTM1-NiV-P	Prof. Dr. Markus Czub, Universität Calgary, Kanada
pTM1-NiV-L	Prof. Dr. Markus Czub, Universität Calgary, Kanada
pCG-MCS	Im Rahmen dieser Arbeit generiert.
pCG-MCS-NiV-N	Im Rahmen dieser Arbeit generiert.
pCG-MCS-NiV-P	Im Rahmen dieser Arbeit generiert.
pCG-NiV-M _{Kozak}	B. Lamp, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCG-mCherry-linker-NiV-M _{Kozak}	B. Lamp, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCG-NiV-M _{K258A}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert.

pCG-NiV-M _{K258R}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert.
pCG-NiV-M _{NESmut}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert.
pCG-NiV-M _{NLSb1/2K}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert.
pCG-S15-NiV-M _{K258A}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert.
pCG-NiV-M _{347-352A}	Im Rahmen dieser Arbeit generiert.
pCG-NiV-G _{HA}	L. Behner, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-NiV-F	E. Haller, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pSC-MV-M	N. Runkler, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-HeV-M	Prof. Dr. Stefan Finke, FLI Riems
pCAGGS-EBOV-VP40	C. Rohde, AG Becker, Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-Lassa-Z _{HA}	S. Fehling, AG Strecker, Institut für Virologie, Marburg
pCG-Rabies-M _{Flag}	S. Fehling, AG Strecker, Institut für Virologie, Marburg
pBR/T7-NiVeGFP	E. Dietzel, AG Becker, Institut für Virologie, Marburg
pBR/T7-NiVeGFP Δ M	E. Dietzel, AG Becker, Institut für Virologie, Marburg
pBR/7-NiV M _{NESmut}	M. Weis, AG Becker, Institut für Virologie, Marburg
pCG-MCS-NiV-P _{eGFP}	P. Schepsky, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCG-MCS-NiV-N _{mCherry}	P. Schepsky, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg

7. Oligonukleotide

Random hexamer

Thermo Fisher, Dreieich

Die nachfolgenden Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg hergestellt:

Sequenzier-Primer:

Bezeichnung	Sequenz
pCG seq MCS-for	5'CATGTTTCATGCCTTCTTC 3'
pCG seq MCS-rev	5'CCAACACACTATTGCAATG 3'
NiV M-seq2-for	5'GGAAGGAGTATCTGATTTCAGC 3'
NiV M-seq3-for	5'CTCTGTCCCTCAAAGTTACTG 3'

Mutagenese-Primer:

Bezeichnung	Sequenz
K258R_F	5'TGTAGGAGGAGGATTGATAGG 3'
K258R_R	5'ATAATCAACAGAGTAATACTTCC 3'
K258A_F	5'TTGTAGGAGGGCTATTGATAGGATGAAATTG 3'

K258A_R	5' TAATCAACAGAGTAATACTTCC 3'
MNLS_b1/2K_F	5' GAACTTTGTCGCTGCTGCAGGGAAGTATTACTCTGTTG3'
MNLS_b1/2K_R	5' CCCAAGTGTAGCATGAAG 3'
ΔNES_F	5' TCCCCAAGATGCTGCTGAGGAACTCTGTTCCC 3'
ΔNES-R	5' TGAGAGGCACTCTTACCAAC 3'
nNiM 348-352A_F	5' GCTGCTGCTTAAAAACCTGCAGGCATG 3'
nNiM 348-352A_R	5' AGCAGCAGCTGTATTGTCAATGAAGACATC 3'
NiV N_NotI-F	5' GGCGGCCGCATGAGTGATATCTTTGAAGAGGCG 3'
NiV N_PacI-R	5' CTTAATTAATCACACATCAGCTCTGACG 3'
NiV P_NotI-F	5' GGCGGCCGCATGGATAAATTGGAAGTCAATG 3'
NiV P_NheI-R	5' CGCTAGCTCAAATATTACCGTCAATGATGTC 3'
S15-M_SalI-F	5' CGTCGACGCCACCATGGGTAGCAACAAGAGCAAGCCC AAGGATGCCAGCCAGCGGCGGAGCCGGACATCAAG 3'
NiV M_PstI-R	5' CCTGCAGGTTTTTAGCCCTTTAG 3'
NiV N 5 diag	5' ATCAATCGTGGTTATCTTGA 3'
NiV N 3 diag	5' CAGCCAGTTCTGCAACTTGATC 3'
Tubulin-α for	5' TCAGTGCGTTACTCACCTCG 3'
Tubulin-α rev	5' AATCAGAGTGCTCCAGGGTG 3'

8. Puffer

DNA Probenpuffer (6x)	0,25 % 40 %	BPB Sucrose
PBS _{def} pH 7,4 (phosphate buffered saline, deficient)	8,0 g 0,2 g 1,15 g 0,2 g ad 1 l	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ mit dH ₂ O
PBS ⁺⁺	PBS _{def} mit MgCl ₂ und CaCl ₂	
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	10 g 30 g 144 g ad 1 l	SDS Tris Glyzin dH ₂ O
SDS-Probenpuffer (2x)	1 ml 2 ml 1 ml 0,1 ml 0,4 ml	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 10 % SDS Glyzerin 2 % BPB dH ₂ O
TBE-Puffer (10x), pH 8,3	121,2 g 51,4 g 3,7 g ad 1 l	Tris Borsäure EDTA dH ₂ O

Transferpuffer	5,8 g	Tris
	2,9 g	Glyzin
	200 ml	EtOH
	ad 1 l	dH ₂ O
Triton-Lysis-Puffer	20 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1 %	Triton X-100

VI. Literaturverzeichnis

- Afonso CL, *et al.* (2016) Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol* 161(8):2351-2360.
- Battisti AJ, *et al.* (2012) Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(35):13996-14000.
- Bauer A, *et al.* (2014) ANP32B is a nuclear target of henipavirus M proteins. *PLoS One* 9(5):e97233.
- Becker N (2017) Das Nipahvirus Matrixprotein: Einfluss von Mutationen auf die Membranassoziation und die Interaktion mit RNPs. Bachelorarbeit (Philipps-Universität Marburg).
- Becker S, Rinne C, Hofsäss U, Klenk HD, & Mühlberger E (1998) Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology* 249(2):406-417.
- Bharaj P, *et al.* (2016) The Matrix Protein of Nipah Virus Targets the E3-Ubiquitin Ligase TRIM6 to Inhibit the IKKε Kinase-Mediated Type-I IFN Antiviral Response. *PLoS Pathog* 12(9):e1005880.
- Bharat TA, *et al.* (2011) Cryo-electron tomography of Marburg virus particles and their morphogenesis within infected cells. *PLoS Biol* 9(11):e1001196.
- Blocquel D, Beltrandi M, Erales J, Barbier P, & Longhi S (2013) Biochemical and structural studies of the oligomerization domain of the Nipah virus phosphoprotein: evidence for an elongated coiled-coil homotrimer. *Virology* 446(1-2):162-172.
- Bonaparte MI, *et al.* (2005) Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(30):10652-10657.
- Bose S, Malur A, & Banerjee AK (2001) Polarity of human parainfluenza virus type 3 infection in polarized human lung epithelial A549 cells: role of microfilament and microtubule. *J Virol* 75(4):1984-1989.
- Capul AA, *et al.* (2007) Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains. *J Virol* 81(17):9451-9460.
- Cathomen T, *et al.* (1998) A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *EMBO J* 17(14):3899-3908.
- Cathomen T, Naim HY, & Cattaneo R (1998) Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol* 72(2):1224-1234.
- CDC (CfDCaP) (1999) Outbreak of Hendra-like virus--Malaysia and Singapore, 1998-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48(13):265-269.
- CDC (CfDCaP) (1999) Update: outbreak of Nipah virus--Malaysia and Singapore, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48(16):335-337.
- Cervantes-Ortiz SL, Zamorano Cuervo N, & Grandvaux N (2016) Respiratory Syncytial Virus and Cellular Stress Responses: Impact on Replication and Physiopathology. *Viruses* 8(5).

- Chan YP, Koh CL, Lam SK, & Wang LF (2004) Mapping of domains responsible for nucleocapsid protein-phosphoprotein interaction of Henipaviruses. *J Gen Virol* 85(Pt 6):1675-1684.
- Chang A & Dutch RE (2012) Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. *Viruses* 4(4):613-636.
- Chen BJ & Lamb RA (2008) Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology* 372(2):221-232.
- Chiu W, *et al.* (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 6(3):325-330.
- Chua KB, *et al.* (2000) Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288(5470):1432-1435.
- Chua KB, *et al.* (1999) Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 354(9186):1257-1259.
- Chua KB, *et al.* (2002) Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect* 4(2):145-151.
- Chua KB, *et al.* (2000) High mortality in Nipah encephalitis is associated with presence of virus in cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 48(5):802-805.
- Ciancanelli MJ & Basler CF (2006) Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. *J Virol* 80(24):12070-12078.
- Cooper GM & Hausmann RE (2009) *The Cell: A Molecular Approach* (Sinauer Associates, Inc.) 5th Ed.
- Cormack BP, Valdivia RH, & Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173(1 Spec No):33-38.
- de Wit E, *et al.* (2014) Foodborne transmission of nipah virus in Syrian hamsters. *PLoS Pathog* 10(3):e1004001.
- Dell'Angelica EC (2009) AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Curr Opin Cell Biol* 21(4):552-559.
- Diederich S, Moll M, Klenk HD, & Maisner A (2005) The nipah virus fusion protein is cleaved within the endosomal compartment. *J Biol Chem* 280(33):29899-29903.
- Diederich S, *et al.* (2012) Activation of the Nipah virus fusion protein in MDCK cells is mediated by cathepsin B within the endosome-recycling compartment. *J Virol* 86(7):3736-3745.
- Diederich S, Thiel L, & Maisner A (2008) Role of endocytosis and cathepsin-mediated activation in Nipah virus entry. *Virology* 375(2):391-400.
- Dietzel E, Kolesnikova L, & Maisner A (2013) Actin filaments disruption and stabilization affect measles virus maturation by different mechanisms. *Virol J* 10:249.
- Dietzel E, *et al.* (2015) Nipah Virus Matrix Protein Influences Fusogenicity and Is Essential for Particle Infectivity and Stability. *J Virol* 90(5):2514-2522.
- Döhner K, Nagel CH, & Sodeik B (2005) Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol* 13(7):320-327.

- Dolnik O, *et al.* (2014) Interaction with Tsg101 is necessary for the efficient transport and release of nucleocapsids in marburg virus-infected cells. *PLoS Pathog* 10(10):e1004463.
- Drexler JF, *et al.* (2012) Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* 3:796.
- Dworetzky SI, Lanford RE, & Feldherr CM (1988) The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake. *J Cell Biol* 107(4):1279-1287.
- Fletcher DA & Mullins RD (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463(7280):485-492.
- Flitney EW, Kuczmarski ER, Adam SA, & Goldman RD (2009) Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments. *FASEB J* 23(7):2110-2119.
- Förster A, Maertens GN, Farrell PJ, & Bajorek M (2015) Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. *J Virol* 89(8):4624-4635.
- García-Mata R, Bebök Z, Sorscher EJ, & Sztul ES (1999) Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* 146(6):1239-1254.
- Goldsmith CS, *et al.* (2003) Elucidation of Nipah virus morphogenesis and replication using ultrastructural and molecular approaches. *Virus Res* 92(1):89-98.
- Goldstein LS & Yang Z (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23:39-71.
- Gupta S, De BP, Drazba JA, & Banerjee AK (1998) Involvement of actin microfilaments in the replication of human parainfluenza virus type 3. *J Virol* 72(4):2655-2662.
- Habchi J & Longhi S (2015) Structural Disorder within Paramyxoviral Nucleoproteins and Phosphoproteins in Their Free and Bound Forms: From Predictions to Experimental Assessment. *Int J Mol Sci* 16(7):15688-15726.
- Halpin K, Bankamp B, Harcourt BH, Bellini WJ, & Rota PA (2004) Nipah virus conforms to the rule of six in a minigenome replication assay. *J Gen Virol* 85(Pt 3):701-707.
- Halpin K, *et al.* (2007) Emerging viruses: coming in on a wrinkled wing and a prayer. *Clin Infect Dis* 44(5):711-717.
- Harcourt BH, *et al.* (2001) Molecular characterization of the polymerase gene and genomic termini of Nipah virus. *Virology* 287(1):192-201.
- Harcourt BH, *et al.* (2000) Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology* 271(2):334-349.
- Harrison MS, Sakaguchi T, & Schmitt AP (2010) Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int J Biochem Cell Biol* 42(9):1416-1429.
- Hoenen T, *et al.* (2012) Inclusion bodies are a site of ebolavirus replication. *J Virol* 86(21):11779-11788.
- Hooper P, Zaki S, Daniels P, & Middleton D (2001) Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3(4):315-322.

- Huber M, *et al.* (1991) Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology* 185(1):299-308.
- Hyatt AD, Zaki SR, Goldsmith CS, Wise TG, & Hengstberger SG (2001) Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect* 3(4):297-306.
- Iwasaki M, *et al.* (2009) The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *J Virol* 83(20):10374-10383.
- Johansson K, *et al.* (2003) Crystal structure of the measles virus phosphoprotein domain responsible for the induced folding of the C-terminal domain of the nucleoprotein. *J Biol Chem* 278(45):44567-44573.
- Johnston GP, *et al.* (2017) Cytoplasmic Motifs in the Nipah Virus Fusion Protein Modulate Virus Particle Assembly and Egress. *J Virol* 91(10).
- Johnston GP, *et al.* (2017) Cytoplasmic Motifs in the Nipah Virus Fusion Protein Modulate Virus Particle Assembly and Egress. *J Virol* 91(10).
- Johnston JA, Ward CL, & Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143(7):1883-1898.
- Katayama H, *et al.* (2004) Role of actin microfilaments in canine distemper virus replication in vero cells. *J Vet Med Sci* 66(4):409-415.
- Khan SU, *et al.* (2012) A randomized controlled trial of interventions to impede date palm sap contamination by bats to prevent nipah virus transmission in Bangladesh. *PLoS One* 7(8):e42689.
- Klauschies F, *et al.* (2010) Viral infectivity and intracellular distribution of matrix (M) protein of canine distemper virus are affected by actin filaments. *Arch Virol* 155(9):1503-1508.
- Koehler A, *et al.* (2015) A Single Amino Acid Change in the Marburg Virus Matrix Protein VP40 Provides a Replicative Advantage in a Species-Specific Manner. *J Virol* 90(3):1444-1454.
- Kolesnikova L, Mühlberger E, Ryabchikova E, & Becker S (2000) Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *J Virol* 74(8):3899-3904.
- Kosugi S, *et al.* (2009) Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem* 284(1):478-485.
- Kristensson K, Dastur DK, Manghani DK, Tsiang H, & Bentivoglio M (1996) Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22(3):179-187.
- Lahaye X, *et al.* (2009) Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol* 83(16):7948-7958.
- Lamb RA & Kolakofsky D (2001) *Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In Fields Virology.* (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia) 4th Ed.

- Lamb RA & Parks GD (2013) *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. In *Fields Virology*. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia) 6th Ed.
- Lamp B (2008) Untersuchungen zum Nipahvirus Matrixprotein. Diplomarbeit (Philipps-Universität Marburg).
- Lamp B (2013) Bedeutung des Matrixproteins für das Assembly hochpathogener Nipahviren. Doktorarbeit (Philipps-Universität Marburg).
- Lamp B, *et al.* (2013) Nipah virus entry and egress from polarized epithelial cells. *J Virol* 87(6):3143-3154.
- Liljeroos L, Huiskonen JT, Ora A, Susi P, & Butcher SJ (2011) Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(44):18085-18090.
- Lim RY, Aebi U, & Fahrenkrog B (2008) Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex. *Histochem Cell Biol* 129(2):105-116.
- Lo MK & Rota PA (2008) The emergence of Nipah virus, a highly pathogenic paramyxovirus. *J Clin Virol* 43(4):396-400.
- Longhi S (2015) Structural disorder within paramyxoviral nucleoproteins. *FEBS Lett* 589(19 Pt A):2649-2659.
- Loureiro ME, *et al.* (2011) Molecular determinants of arenavirus Z protein homo-oligomerization and L polymerase binding. *J Virol* 85(23):12304-12314.
- Luby SP, *et al.* (2006) Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 12(12):1888-1894.
- Maar D, *et al.* (2012) Cysteines in the stalk of the nipah virus G glycoprotein are located in a distinct subdomain critical for fusion activation. *J Virol* 86(12):6632-6642.
- Marfori M, *et al.* (2011) Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* 1813(9):1562-1577.
- Marsh GA, *et al.* (2012) Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats. *PLoS Pathog* 8(8):e1002836.
- Melvin AT, Woss GS, Park JH, Waters ML, & Allbritton NL (2013) Measuring activity in the ubiquitin-proteasome system: from large scale discoveries to single cells analysis. *Cell Biochem Biophys* 67(1):75-89.
- Mitra R, Baviskar P, Duncan-Decocq RR, Patel D, & Oomens AG (2012) The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. *J Virol* 86(8):4432-4443.
- Moll M, Diederich S, Klenk HD, Czub M, & Maisner A (2004) Ubiquitous activation of the Nipah virus fusion protein does not require a basic amino acid at the cleavage site. *J Virol* 78(18):9705-9712.
- Moll M, Klenk HD, & Maisner A (2002) Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses. *J Virol* 76(14):7174-7186.
- Mottet G, Mühlemann A, Tapparel C, Hoffmann F, & Roux L (1996) A Sendai virus vector leading to the efficient expression of mutant M proteins interfering with virus particle budding. *Virology* 221(1):159-171.

- Mottet-Osman G, *et al.* (2007) Suppression of the Sendai virus M protein through a novel short interfering RNA approach inhibits viral particle production but does not affect viral RNA synthesis. *J Virol* 81(6):2861-2868.
- Murray K, *et al.* (1995) A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* 268(5207):94-97.
- Negrete OA, *et al.* (2005) EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. *Nature* 436(7049):401-405.
- Negrete OA, *et al.* (2006) Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. *PLoS Pathog* 2(2):e7.
- Nozawa N, Yamauchi Y, Ohtsuka K, Kawaguchi Y, & Nishiyama Y (2004) Formation of aggresome-like structures in herpes simplex virus type 2-infected cells and a potential role in virus assembly. *Exp Cell Res* 299(2):486-497.
- Oda S, *et al.* (2015) Crystal Structure of Marburg Virus VP40 Reveals a Broad, Basic Patch for Matrix Assembly and a Requirement of the N-Terminal Domain for Immunosuppression. *J Virol* 90(4):1839-1848.
- Pager CT & Dutch RE (2005) Cathepsin L is involved in proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein. *J Virol* 79(20):12714-12720.
- Park A, *et al.* (2016) Nipah Virus C Protein Recruits Tsg101 to Promote the Efficient Release of Virus in an ESCRT-Dependent Pathway. *PLoS Pathog* 12(5):e1005659.
- Park MS, *et al.* (2003) Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *J Virol* 77(2):1501-1511.
- Patch JR, Crameri G, Wang LF, Eaton BT, & Broder CC (2007) Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central role for the matrix protein. *Virol J* 4:1.
- Patch JR, *et al.* (2008) The YPLGVG sequence of the Nipah virus matrix protein is required for budding. *Virol J* 5:137.
- Pentecost M, *et al.* (2015) Evidence for ubiquitin-regulated nuclear and subnuclear trafficking among Paramyxovirinae matrix proteins. *PLoS Pathog* 11(3):e1004739.
- Perez M, Greenwald DL, & de la Torre JC (2004) Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *J Virol* 78(20):11443-11448.
- Ray G, Schmitt PT, & Schmitt AP (2016) C-Terminal DxD-Containing Sequences within Paramyxovirus Nucleocapsid Proteins Determine Matrix Protein Compatibility and Can Direct Foreign Proteins into Budding Particles. *J Virol* 90(7):3650-3660.
- Rockx B, *et al.* (2011) Clinical outcome of henipavirus infection in hamsters is determined by the route and dose of infection. *J Virol* 85(15):7658-7671.
- Rodgers W (2002) Making membranes green: construction and characterization of GFP-fusion proteins targeted to discrete plasma membrane domains. *Biotechniques* 32(5):1044-1046, 1048, 1050-1041.

- Runkler N, Pohl C, Schneider-Schaulies S, Klenk HD, & Maisner A (2007) Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiol* 9(5):1203-1214.
- Sadler AJ & Williams BR (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8(7):559-568.
- Santangelo PJ & Bao G (2007) Dynamics of filamentous viral RNPs prior to egress. *Nucleic Acids Res* 35(11):3602-3611.
- Sauerhering L (2014) Einfluss von Wirtsfaktoren auf die Nipahvirus-Infektion humaner und porciner Bronchial-Epithelzellen. Doktorarbeit (Philipps-Universität Marburg).
- Sauerhering L, *et al.* (2016) Species-specific and individual differences in Nipah virus replication in porcine and human airway epithelial cells. *J Gen Virol* 97(7):1511-1519.
- Schepsky P (2016) Untersuchungen zur Bildung und Lokalisation von Nipahvirus *inclusion bodies* mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie. Masterarbeit (Philipps-Universität Marburg).
- Schudt G, *et al.* (2015) Transport of Ebolavirus Nucleocapsids Is Dependent on Actin Polymerization: Live-Cell Imaging Analysis of Ebolavirus-Infected Cells. *J Infect Dis* 212 Suppl 2:S160-166.
- Schudt G, Kolesnikova L, Dolnik O, Sodeik B, & Becker S (2013) Live-cell imaging of Marburg virus-infected cells uncovers actin-dependent transport of nucleocapsids over long distances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(35):14402-14407.
- Shaner NC, *et al.* (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22(12):1567-1572.
- Shaw ML, Cardenas WB, Zamarin D, Palese P, & Basler CF (2005) Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways. *J Virol* 79(10):6078-6088.
- Shenoy-Scaria AM, Gauen LK, Kwong J, Shaw AS, & Lublin DM (1993) Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Cell Biol* 13(10):6385-6392.
- Stahelin RV (2014) Membrane binding and bending in Ebola VP40 assembly and egress. *Front Microbiol* 5:300.
- Strecker T, *et al.* (2006) The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z. *Virology* 343:93.
- Sun W, *et al.* (2014) Matrix proteins of Nipah and Hendra viruses interact with beta subunits of AP-3 complexes. *J Virol* 88(22):13099-13110.
- Tahara M, Takeda M, & Yanagi Y (2007) Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *J Virol* 81(13):6827-6836.

- Takimoto T, Murti KG, Bousse T, Scroggs RA, & Portner A (2001) Role of matrix and fusion proteins in budding of Sendai virus. *J Virol* 75(23):11384-11391.
- Takimoto T & Portner A (2004) Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res* 106(2):133-145.
- Tamin A, *et al.* (2002) Functional properties of the fusion and attachment glycoproteins of Nipah virus. *Virology* 296(1):190-200.
- Tan WS, Ong ST, Eshaghi M, Foo SS, & Yusoff K (2004) Solubility, immunogenicity and physical properties of the nucleocapsid protein of Nipah virus produced in *Escherichia coli*. *J Med Virol* 73(1):105-112.
- Terry LJ, Shows EB, & Wente SR (2007) Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318(5855):1412-1416.
- Vogt C, Eickmann M, Diederich S, Moll M, & Maisner A (2005) Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins. *J Virol* 79(6):3865-3872.
- Walpita P, Barr J, Sherman M, Basler CF, & Wang L (2011) Vaccine potential of Nipah virus-like particles. *PLoS One* 6(4):e18437.
- Wang LF, *et al.* (2000) The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae. *J Virol* 74(21):9972-9979.
- Wang L, *et al.* (2001) Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3(4):279-287.
- Wang YE, *et al.* (2010) Ubiquitin-regulated nuclear-cytoplasmic trafficking of the Nipah virus matrix protein is important for viral budding. *PLoS Pathog* 6(11):e1001186.
- Ward BM (2011) The taking of the cytoskeleton one two three: how viruses utilize the cytoskeleton during egress. *Virology* 411(2):244-250.
- Watkinson RE & Lee B (2016) Nipah virus matrix protein: expert hacker of cellular machines. *FEBS Lett* 590(15):2494-2511.
- Wear MA, Schafer DA, & Cooper JA (2000) Actin dynamics: assembly and disassembly of actin networks. *Curr Biol* 10(24):R891-895.
- Weise C, *et al.* (2010) Tyrosine residues in the cytoplasmic domains affect sorting and fusion activity of the Nipah virus glycoproteins in polarized epithelial cells. *J Virol* 84(15):7634-7641.
- Welch MD & Mullins RD (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:247-288.
- Wiche G (1998) Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* 111 (Pt 17):2477-2486.
- Wittwer K (2016) Ability of different matrix proteins to transport Nipah virus nucleocapsids. Bachelorarbeit (Philipps-Universität Marburg).
- Wollert T, *et al.* (2009) The ESCRT machinery at a glance. *J Cell Sci* 122(Pt 13):2163-2166.
- Wong KT, *et al.* (2003) A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. *Am J Pathol* 163(5):2127-2137.
- Wu Z, *et al.* (2014) Novel Henipa-like virus, Mojiang Paramyxovirus, in rats, China, 2012. *Emerg Infect Dis* 20(6):1064-1066.

- Yacovone SK, *et al.* (2016) Migration of Nucleocapsids in Vesicular Stomatitis Virus-Infected Cells Is Dependent on both Microtubules and Actin Filaments. *J Virol* 90(13):6159-6170.
- Yob JM, *et al.* (2001) Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis* 7(3):439-441.
- Yoneda M, *et al.* (2006) Establishment of a Nipah virus rescue system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44):16508-16513.

VII. Anhang

A.1 Abkürzungsverzeichnis

A549	humane alveoläre Lungenepithelzellen
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
ANP32B	<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B</i>
AP	Adaptorprotein
AS	Aminosäure
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
BSL-4	<i>Biosafety level 4</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CeV	Cedarvirus
CDV	Hundestaupevirus
CPE	cytopathischen Effekt
Crm1	<i>chromosomal region maintenance 1</i>
CTR	C-terminalen Region
CytoD	Cytochalasin D
D	Dimer
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
def	<i>deficient</i>
DG	Deckgläschen
d. h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes, entionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Di-Desoxyribonukleotidphosphate
EBOV	Ebolavirus
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i>
eGFP	<i>engineered green fluorescent protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
Em.	Emission
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin

ESCRT <i>et al.</i> Ex.	<i>endosomal sorting complex required for transport</i> et aliter (und andere) Extinktion
F FCS FISH	Fusionsprotein fötales Kälberserum <i>Fluorescent in situ hybridization</i>
g G GA GM130 GP3 G3BP1	gramm Glykoprotein Glutaraldehyd Golgi Matrixprotein 130 Serum eines NiV-infizierten Meerschweinchens <i>RasGAP SH3-domain-binding protein 1</i>
h HeLa HEPES HeV hMPV hPIV HRP Huh7	Stunde humane Zervixzellen 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Hendravirus Humanes Metapneumovirus Humanes Parainfluenzavirus <i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase) humane Hepatom Zelllinie
IB IFA IFN IG IgG IKKε Imp-α IP ISG	<i>inclusion body</i> Immunfluoreszenzanalyse Interferon ImmunoGlobe Immunglobulin G IκB kinase-ε Importin-α Immunpräzipitation IFN-stimulierten Genen
k kb KLD KV	Kilo Kilobasenpaare Kinase-Ligase-DpnI Kumasivirus
l L Lamp1 LASV LB LFA 2000 LMB	Liter Polymerase <i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i> Lassavirus <i>liquid broth</i> <i>Lipofectamine 2000 Transfection Reagent</i> Leptomycin B

m	Meter
m	mili
M	Matrixprotein
M	molar (mol/l)
M	Monomer
MAB	monoklonaler Antikörper
MAPs	<i>microtubule associated proteins</i>
MARV	Marburgvirus
mCherry	<i>monomeric red fluorescent protein Cherry</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MD	Multimerisationsdomäne
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
ME	Mercaptoethanol
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
min	Minuten
mol	Mol
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MojV	Mojiangvirus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT	Mikrotubuli
MTOC	<i>microtubule organizing center</i>
mut	mutiert
MuV	Mumpsvirus
MV	Masernvirus
n	Nano
N	Nukleoprotein
NDV	<i>Newcastle Disease Virus</i>
NES	<i>nuclear export signal</i> (Kernexportsignal)
NEB	New England Biolabs
NiV	Nipahvirus
NLS	<i>nuclear localization signal</i> (Kernimportsignal)
Noco	Nocodazol
NPC	<i>nuclear cor complex</i>
NTR	N-terminale Region
O	Oligomer
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	Piko
P	Phosphoprotein
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBMEC	<i>primary porcine brain microvascular endothelial cells</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potential hydrogenii</i>

PI	Protease-Inhibitor
p.i.	<i>post infection</i> (nach der Infektion)
PM	Plasmamembran
PMP70	70-kDa <i>peroxisomal membrane protein</i>
PP	Probenpuffer
p.t.	<i>post transfection</i> (nach der Transfektion)
qPCR	Quantitative Real-Time-PCR
RABV	Tollwutvirus
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Nukleokapsid
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
sec	Sekunde
SeV	Sendaivirus
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Tetramer
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCID ₅₀	<i>tissue culture infective dosis</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIM	<i>Tripartite Motif</i>
TRITC	Tetramethylrhodamine
Tsg101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
TWEEN-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
TX	Triton X-100
U	units (Einheiten)
UV	Ultraviolett
ÜS	Überstand
vgl.	vergleiche
VLP	<i>virus-like particle</i> (Virus-ähnliches Partikel)
VP40	Matrixprotein (Filoviren)
X	beliebige Aminosäure
XD	C-terminale X Domäne
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

μ Mikro
 λ Wellenlänge

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glyzin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

A.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle I.1:	Taxonomie der Mononegavirales (modifiziert nach Afonso <i>et al.</i> , 2016) .	5
Tabelle III.1:	Verwendete <i>templates</i> und Primer zur Umklonierung von NiV-N und -P.	
	74
Tabelle III.2:	Verwendete Primer zur Herstellung der NiV-M-Mutanten	76
Tabelle III.3:	Verwendete Zelllinien	82
Tabelle III.4:	Aussäen der Zellen auf unterschiedliche Kulturgefäße	83
Tabelle III.5:	Transfektionsansätze mit LFA 2000 und FuGENE HD	84
Tabelle III.6:	Auslistung der verwendeten rekombinanten Viren	86
Tabelle III.7:	Antikörper zur Färbung von NiV Proteinen in der Einzeldexpression	88
Tabelle III.8:	Antikörper zur Färbung von NiV-M, -N und -P in infizierten Vero76-Zellen	
	89
Tabelle III.9:	Verwendete Antikörper zur Färbung von zellulären Kompartimenten...	90
Tabelle III.10:	Verwendete Antikörper zur Färbung viraler Matrixproteine	91
Tabelle III.11:	Verwendete Antikörper zur Färbung von NiV M und Zytoskelett-Markern	
	in transfizierten Vero76-Zellen	92
Tabelle III.12:	Plasmid-Kombinationen zur Untersuchung der getaggten NiV Proteine	96

A.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung I.1: Schematische Darstellung (A) des NiV-Partikels und (B) des NiV-Genoms.	7
Abbildung I.2: Schematische Darstellung des NiV-Replikationszyklus.	9
Abbildung I.3: Schematische Darstellung des reversen Genetik-Systems (modifiziert nach Frau Prof. Dr. A. Maisner 2002 Habilitationsschrift).	11
Abbildung I.4: Darstellung der NDV-M Struktur mittels Kryo-Elektrotomographie (aus Battisti <i>et al.</i> , 2012).	16
Abbildung I.5: Schematische Darstellung des NiV-Ms und sein intrazellulärer Transportweg (modifiziert nach Watkinson und Lee, 2016).	17
Abbildung I.6: Schematische Darstellung der Zytoskelett-Bestandteile.	21
Abbildung II.1: Lokalisation von NiV-M und NiV-M-Mutanten in unterschiedlichen Zelllinien.	25
Abbildung II.2: Lokalisation von IB und M in rNiV-infizierten und kotransfizierten Vero76-Zellen.	29
Abbildung II.3: Kolokalisation von NiV-IB mit zellulären Kompartimenten.	31
Abbildung II.4: Kolokalisationsstudien von NiV-N, NiV-P und NiV-M.	33
Abbildung II.5: <i>Live cell imaging</i> -Studien zur IB-Bildung.	35
Abbildung II.6: Elektronenmikroskopische Untersuchung von NiV-N, -P und -M transient exprimierenden Zellen.	37
Abbildung II.7: Kolokalisation von NiV-IB und anderen viralen Matrixproteinen.	40
Abbildung II.8: Kolokalisation von IB mit NiV-M Kernimport- und Kernexport-Mutanten.	43
Abbildung II.9: Charakterisierung einer rekombinatem NiV-Mutante (rNiV-M _{NESmut}).	46
Abbildung II.10: Oligomerisierung der M-Mutanten.	48
Abbildung II.11: Kolokalisation von M mit Tubulin bzw. Aktin in An- und Abwesenheit von Nocodazool bzw. Cytochalasin D.	50
Abbildung II.12: Kolokalisation von M und IB mit Tubulin oder Aktin in An- und Abwesenheit von Nocodazool oder Cytochalasin D.	52
Abbildung II.13: Lokalisationsstudien eines M mit deletierten C-Terminus.	55
Abbildung III.1: Modell zum NiV-M und Aktin-abhängigen NiV-RNP Transport an die Plasmamembran.	70

Abbildung IV.1: Schematische Darstellung der gerichteten Mutagenese mittels Site-Directed Mutagenesis Kit.	75
Abbildung IV.2: Austitrieren der optimalen Konzentration von Zytoskelett-Inhibitoren.	85
Abbildung IV.3: Einzelschritte bei der Verwendung des ImageJ-Makros NukLoM.	94
Abbildung IV.4: Verteilung von eGFP- und mCherry-getaggten NiV-Proteinen.	97

A.4 Publikationsliste

Veröffentlichungen

Laura Behner, Louisa Zimmermann, **Marc Ringel**, Michael Weis und Andrea Maisner (2017): *Influence of oligomerization, glycosylation and endocytosis on the bioactivity of an African bat henipavirus G protein with unknown zoonotic potential. (submitted).*

Marc Ringel, Sandro Halwe, Anja Heiner, Laura Behner, Lucie Sauerhering, Nico Becker, Michael Weis, Erik Dietzel, Larissa Kolesnikova, Stephan Becker, Veronika von Messling und Andrea Maisner (2017): *Nipah virus nucleocapsid transport to the cell periphery requires functional matrix proteins and intact actin filaments. (manuscript in preparation).*

Vorträge

Marc Ringel, Pauline Schepsky, Boris Lamp and Andrea Maisner (2016): *Nipah virus matrix protein nuclear trafficking is cell-type independent. 26th Annual Meeting of the Society for Virology (GFV 2016), 06.04 – 09.04.2016, Münster, Deutschland*

Poster

Boris Lamp, Erik Dietzel, **Marc Ringel**, Larissa Kolesnikova, Andrea Maisner (2013): *Studies on fluorescently labeled Nipah virus matrix protein. Negative Strang Virus Meeting (NSV 2013), Granada, Spanien*

Marc Ringel, Pauline Schepsky, Kevin Wittwer, Boris Lamp and Andrea Maisner (2016): *Nuclear trafficking of Nipah virus matrix protein is cell-type independent. 35th Annual Meeting for the American Society for Virology (ASV 2016), 18.06. – 22.06.2016, Blacksburg, Virginia, USA.*

Julian Hüther, Laura Behner, Cornelius Rohde, Verena Krähling, **Marc Ringel**, and Andrea Maisner (2017): *Induction of the unfolded protein response by Henipavirus glycoproteins. 27th Annual Meeting of the Society for Virology (GFV 2017)*, 22.03 – 25.03.2017, Marburg, Deutschland

Julian Hüther, Laura Behner, Cornelius Rohde, Verena Krähling, **Marc Ringel**, and Andrea Maisner (2017): *Henipavirus glycoproteins induce the unfolded protein response. 68. Mosbacher Kolloquium – „Cell Organelles – Origin, Dynamics, Communication“*, 30.03 – 01.04.2017, Marburg, Deutschland

A.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren in Göttingen:

Ackermann, Braus, Dickmanns, Diederichsen, Feußner, Ficner, Fischer, Friedl, Gatz, Göpfert, Heineke, Hodac, Kappler, Köhler, Leuschner, Lipka, Morgenstern, Pöggeler, Schwerdtfeger, Stalke, Stülke, Teichmann, Valerius, Willmann, Wimmer,

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren in Marburg:

Bauer, Baumeister, Becker, Bremer, Brune, Conrad, Heider, Huber, Frenzel, Lingelbach, Maisner, Przyborski, Rexer, Sogaard-Andersen, Thanbichler.

A.6 Danksagung

Ich möchte Frau Prof. Dr. Andrea Maisner danken, dass sie mir ermöglicht hat in ihrer Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke Ihr für die stets konstruktiven Diskussionen, für die Unterstützung bei wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen, für das Korrekturlesen der Arbeit und für die Bereitstellung dieses spannenden Themas.

Herrn Prof. Dr. Stephan Becker danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und ein rundum angenehmes Arbeitsklima am Institut für Virologie. Auch möchte ich mich für das rege Interesse und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft im Rahmen der Marphili-Simulation bedanken.

Herrn Prof. Dr. Stefan Finke danke ich für die Bereitstellung des Hendravirus-Serums und des HeV-M Expressionsplasmids.

Frau Dr. Larissa Kolesnikowa danke ich für Ihre Mühe, Zeit und die gelungenen Elektronenmikroskopie-Bilder sowie für die Erklärung was man auf diesen erkennen kann.

Der Jürgen Manchot Stiftung danke ich für die Finanzierung meiner Arbeit.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für die freundliche Aufnahme, die stetige Hilfsbereitschaft und für ein „Wohlfühloasen“-artiges Arbeitsumfeld danken.

Boris danke ich für die tolle Einarbeitung in sein/mein Thema, für die Einführung in die Konfokal- und Lebendzell-Mikroskopie, für das Überlassen des M-Projekts und nicht zu zuletzt für einen Arbeitskollegen mit dem das Lachen nie zu kurz kam.

Anja, Erik, Laura, Lucie und Michael danke ich besonders für die Klonierungen der Vollen-Länge-Plasmiden, die *virus rescues* und für die aufwendigen Infektionsversuche im BSL-4-Labor.

Anja danke, dass du den Laden zusammenhältst und mich bei meinen Experimenten unterstützt hast.

Der morgendlichen und nachmittäglichen Kaffeerunde möchte ich für die liebevolle Aufnahme und die vielen Tränen danken. Auch wenn ich aus dem zweitcoolsten Labor komme, weiß ich doch, dass ich jederzeit bei euch herzlich willkommen bin. Ebenfalls bedanken möchte ich mich für die mittlerweile zahlreichen amüsanten, außerdienstlichen Unternehmungen und freue mich auf viele weitere.

Kevin, Nico, Pauline, Pia, Steffen und Tay möchte ich danken, dass sie im Rahmen ihrer Bachelor- oder Masterarbeit und Praktika an dem M-Projekt mitgewirkt haben. Vorallem möchte ich Nico für die Zuverfügungstellung seines Flotationsassay danken.

Sandro möchte ich für die unzähligen Stunden danken, die benötigt wurden, um NukLoM zu programmieren. Ohne dich würde ich immer noch vor dem PC sitzen und quantifizieren.

Laura und Svenja danke ich für die vergangenen Monate und die konstruktive Zeit im Schreibraum, in der natürlich nie gelacht wurde.

Dem gesamten Institut danke ich für die Bereitstellung von Plasmiden und Antikörpern, aber vorallem für die pausenlose Hilfsbereitschaft und die super Stimmung am Institut für Virologie.

Gordian, Nadine, Michael, Tanja, Boris, Alex, Corni, Sandro, Helena, Jaana und Mareike danke ich für die meist amüsante Zeit die wir im Rahmen der Marphili-Simulation hatten. Vorallem das Konzipieren und Organisieren dieser Simulation hat mir viel Spaß bereitet.

Thomas, Michael, Jan, Julian, Sandro und Corni danke ich für die vielen lustigen Abende, sei es ein Wochenende lang auf einer LAN, beim Mittwoch, ein Fußballspiel zu schauen, die Legenden von Andor zu rocken oder mein neues Hobby zu verfolgen.

Birgit, Daniela und Sabine danke ich für ihre Hilfsbereitschaft in jeder Lage, auch wenn das Anliegen manchmal noch so banal war.

Erik, Laura, Lucie und Mareike danke ich für das Korrektur lesen der Arbeit, sowie Gerhard und Laura für die Korrektur meiner Rechtschreibfehler.

Ein ganz besonders Dankeschön geht an meine Familie, insbesondere meinen Eltern, und Laura für ihre ständige Unterstützung und all ihr Verständnis in den letzten Jahren.